



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MÔNICA CARDOSO SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE ALCALOIDES INDÓLICOS EM AMOSTRAS DE AYAHUASCA**

***DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF
INDOLE ALKALOIDS IN AYAHUASCA SAMPLES***





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

MÔNICA CARDOSO SANTOS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO
DE ALCALOIDES INDÓLICOS EM AMOSTRAS DE AYAHUASCA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Química, da Universidade Federal de
Sergipe, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

Coorientador: Prof. Dr. Alain Gaujac

***DEVELOPMENT OF METHOD FOR DETERMINATION OF
INDOLE ALKALOIDS IN AYAHUASCA SAMPLES***

*Dissertation presented to the
Graduate Program in Chemistry, from
Federal University of Sergipe, to get
MSc. in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237d Santos, Mônica Cardoso
Desenvolvimento de método para determinação de alcaloides indólicos em amostras de ayahuasca / Mônica Cardoso Santos ; orientador Sandro Navickiene. – São Cristóvão, 2016.
114 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Ayahuasca. 2. Alcaloides indólicos. 3. Extração (Química). 4. Cromatografia a líquido. I. Navickiene, Sandro, Orient. II. Título.

CDU 547.944.8



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SERGIPE

Programa de Pós-graduação em
Química - PPGQ



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação
de Mestrado de Mônica Cardoso Santos
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal de Sergipe em
24/02/2016.

Prof. Dr. Sandro Navickiene
DQI-UFS

Prof. Dr. Alain Gaujac
Instituto Federal de Sergipe – Campus São Cristovão

Prof.ª Dr.ª Flaviana Cardoso Damasceno
DQI, UFS

Prof.ª Dr.ª Fabíola Manhas Verbi Pereira
Instituto de Química-UNESP

RESUMO

Ayahuasca é uma bebida psicoativa preparada pela decocção de caules da *Banisteriopsis caapi* com folhas da *Psycotria viridis*. Inicialmente esta bebida foi utilizado por tribos indígenas sul-americanas, porém atualmente o consumo está disseminado em todo o mundo devido à expansão de centros religiosos nos quais a ayahuasca é considerada um sacramento. Neste contexto, o presente trabalho propõe um método para determinação dos alcaloides triptamina, *N*, *N*-dimetiltriptamina, harmalol, harmina, harmalina e tetrahydroharmina em amostras de ayahuasca empregando as técnicas de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência e detector com arranjo de diodos (HPLC-DAD). Testes realizados com soluções padrão dos alcaloides permitiram o ajuste das condições cromatográficas para determinação simultânea dos analitos. A melhor reposta analítica para o procedimento de extração foi empregando o cartucho de sílica. A validação do método analítico apresentou linearidade na faixa de 0,9950 a 0,9998 e sensibilidade no intervalo de concentração de 1-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$; exatidão e precisão, com valores de recuperação entre 45,0 - 107,4% e coeficientes de variação entre 1,1 - 9,8%; limites de detecção e quantificação na faixa de 6,8 - 18,8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20,6 - 57,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Além disso, a capacidade adsorptiva de duas novas fases sólidas [biocarvão e SiMen(M)TSC] foi verificada apresentando resultados satisfatórios de recuperação na faixa de 40,6 - 116,2% e 45,3 - 115,7%, respectivamente. As concentrações destes alcaloides foram determinadas na bebida ayahuasca, cedidas sem fins lucrativos por centro religioso na cidade de Fortaleza, apresentado valores entre 0,3 - 36,7 g L^{-1} .

Palavras-chave: Ayahuasca, alcaloides indólicos, SPE, HPLC-DAD.

ABSTRACT

Ayahuasca is a psychoactive beverage prepared by decoction of stems and leafs from Banisteriopsis caapi and Psycotria viridis, respectively. Initially, this tea was used by South America Indian tribes, but nowadays, the consumption is spread all over the world due the growth of religious groups where ayahuasca is considered a sacrament. In this work, we propose a method for determination of the alkaloids: Tryptamine, N, N – Dimethyltryptamine, Harmalol, Harmine, Harmaline and Tetrahydroharmine in ayahuasca samples by HPLC/DAD system using Solid Phase Extraction technique as sample preparation. Tests carried out with standard solutions of alkaloids allowed the adjustment of the chromatographic conditions for simultaneous determination of analytes. The best analytic answer for extraction procedure was employing silica cartridge. The validation of the analytical method showed linearity in the range of 0.9950 a 0.9998 and sensitivity in the concentration range of 1-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ accuracy and precision, with recovery values between 45.0 to 107.4% and variation coefficients between 1.1 to 9.8%; limits of detection and quantification in the range of 6.8 - 18.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 20.6 - 57.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Moreover, the adsorptive capacity of two new solid phases [Biochar and SiMen(M)TSC] was observed with satisfactory recovery results in the range of 40.6 - 116.2 and 45.3 - 115.7%, respectively. The concentrations of these alkaloids were determined in ayahuasca beverage from nonprofit religious cult of the Fortaleza City showed to range from 0.3 to 36.7 g L^{-1} .

Keywords: Ayahuasca, indole alkaloid, SPE, HPLC-DAD.

Dedico aos meus pais Silvano Barreto e José Cardoso, bem como ao meu querido noivo Renan Lira, por todo suporte para que esse trabalho fosse bem sucedido, assim como todo apoio emocional necessário durante esse período. Amo vocês!

“Nossas dívidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar pelo simples medo de arriscar”.

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A Deus que é presença constante em minha vida e me dá força e fé.

Ao meu orientador Prof^o. Dr. Sandro Navickiene pela constante presença, ensinamentos, confiança para realização desse trabalho e também por ser para mim modelo de conduta profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Prof^o. Dr. Alain Gaujac por todos os aprendizados, dedicação, confiança depositada em mim ao longo desses meses, além da disponibilidade a todo o momento para ajudar e esclarecer dúvidas.

A Prof^a. Dra. Luciane Pimenta Cruz Romão pela oportunidade, orientação e ensinamentos durante a iniciação científica, proporcionando o meu engajamento no meio científico.

As professoras doutoras Fabíola Manhas Verbi Pereira, Flaviana Cardoso Damasceno e Luciane Pimenta Cruz Romão que compuseram a banca examinadora da defesa de Dissertação.

Ao meu querido e amado noivo Renan Lira de Farias por todo apoio, ternura e companheirismo durante a efetivação desse trabalho.

Aos meus pais Silvany Barreto e José Cardoso, por sempre me apoiarem e me darem suporte para correr atrás dos meus sonhos. Aos meus irmãos Cleverson e Viviane pelo incentivo na realização desse trabalho, bem como aos meus sobrinhos Ana Clara e Gustavo, que tia ama muito, porém fica ausente em alguns momentos.

Ao meu grande amigo Michel Rubens (feião) por toda ajuda e parceria desde a graduação;

Aos meus amigos pós-graduandos, em especial: Schnaider, Ingrid, Dayara, Juciara, Talita e Danilo pelos estudos, discussões e amizade.

A todos os amigos que compõe o LCP, PEB, LEMON, LSAM e LQA em especial: Édica, Nilmara, Fernanda (escravinha), Priscilla, Bruno, Grazy, Renata (buxexa), Ivory, Wandson e Ana Carla pelos momentos de ajuda, distração e risadas.

Ao estimado Prof^o. Dr. Adriano Bof de Oliveira e ao colaborador mestre Renan Lira da Universidade Federal de Sergipe pela contribuição do material SiMen(M)TSC.

Ao Prof^o Dr. Andersson Barison e a doutoranda Maria de Fátima da Universidade Federal do Paraná por toda contribuição nos dados do RMN para o alcaloide tetrahidroharmina.

Ao Prof^o Dr. Alberto Wisniewski Júnior e as alunas Ingrid Suellen e Fernanda Apolônio da Universidade Federal de Sergipe pela contribuição do material de biocarvão (aguapé) através do Processo nº 5525818/2011-5.

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos que contribuíram para a realização de mais essa conquista em minha vida. Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CE – *Capillary Electrophoresis*

GC – *Gas Chromatography*

CONAD - Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DMT – *N, N*-dimetiltryptamina

EM – Efeito Matriz

ESI – *Electrospray Ionization*

FL - *Fluorescence*

HILIC – *Hidrophilic Liquid Chromatography*

HRL – Harmalina

HRM – Harmina

HRO – Harmalol

ICEFLU - Igreja do Culto Eclético da Fluente Luz Universal

IT – *Ion Trap*

LIF – *Laser Induced Fluorescence*

LLE – *Liquid-Liquid Extraction*

MAO – Monoamina oxidase

MS – *Mass Spectrometry*

NPD – *Nitrogen Phosphorus Detector*

pc – peso corporal

qRMN – Ressonância Magnética Nuclear quantitativa

SAM - S-adenosilmetionina

SNC – Sistema Nervoso Central

SPE – *Solid Phase Extraction* (Extração em fase sólida)

SPME – *Solid Phase Microextraction* (Microextração em fase sólida)

THH – Tetrahydroharmina

TRA - Triptamina

UDV - Centro Espírita Beneficente União do Vegetal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Representação das plantas: a) *Banisteriopsis caapi* e b) *Psychotria viridis*. Fonte: http://www.santodaime.be/pt_historia_ayahuasca.html..... 1
- Figura 2** Bebida de ayahuasca produzida pela decocção das plantas *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*. Fonte: <https://www.culturaacriana.wordpress.com/> 2
- Figura 3** Fórmula estrutural do grupo indol..... 3
- Figura 4** Fórmula estrutural básica dos alcaloides indólicos investigados: (a) simples e (b) β -carbolínicos. 4
- Figura 5** (A) Formação de Triptamina e DMT a partir do Triptofano e em (B) Etapas de *N*-alquilações utilizando SAM..... 5
- Figura 6** Biossíntese dos alcaloides simples β -carbolínicos via reações de descarboxilação, imina e Mannich, respectivamente. 7
- Figura 7** Fórmula estrutural dos alcaloides..... 8
- Figura 8** Imagem das amostras da bebida ayahuasca coletadas em centro religioso proveniente da cidade Fortaleza/CE. 21
- Figura 9** Ilustração do preparo da bebida ayahuasca em centro religioso na cidade de Fortaleza/CE..... 22
- Figura 10** Fórmula estrutural da tetrahydroharmina 25
- Figura 11** Espectros de absorção dos alcaloides utilizando cromatógrafo líquido com detector de arranjo de fotodiodos, onde TRA = triptamina, DMT= *N*, *N*-dimetilriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina. 28
- Figura 12** Comparação qualitativa dos cromatogramas resultantes da análise dos alcaloides na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ na coluna Kinetex, sob condições cromatográficas descritas na

Tabela 3 e registradas em 320 nm, onde A= eluição em modo isocrático e B= eluição em modo gradiente, sendo 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	30
Figura 13 Comparação qualitativa dos cromatogramas resultantes da injeção dos alcaloides na concentração de 100 µg mL ⁻¹ na coluna Luna Hilic, sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registradas em 320 nm, onde A= eluição em modo isocrático e B= eluição em modo gradiente, sendo 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	32
Figura 14 Comparação qualitativa dos cromatogramas resultantes da análise dos alcaloides na concentração de 100 µg mL ⁻¹ na coluna Zorbax registrado em 320 nm, onde A= eluição em modo isocrático e B= eluição em modo gradiente, sendo 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	34
Figura 15 Ilustração da superfície de interação entre as partículas do recheio das colunas cromatográficas Kinetex, Luna Hilic e Zorbax Eclipse Plus, e os alcaloides.	35
Figura 16 Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de 0,01 mg mL ⁻¹ , utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	37
Figura 17 Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de 0,01 mg mL ⁻¹ , utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	37

- Figura 18** Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina. 38
- Figura 19** Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina. 39
- Figura 20** Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina. 39
- Figura 21** Cromatograma referente à análise da solução conjunta dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina. 40
- Figura 22** Cromatograma referente à análise da solução conjunta dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina. 41
- Figura 23** Cromatograma referente à análise da solução conjunta dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a

coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	41
Figura 24 Cromatograma referente à análise do branco do método cromatográfico, sob as condições cromatográficas listadas na Tabela 3.	42
Figura 25 Cromatograma referente à análise da amostra de ayahuasca, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registradas em 320 nm, onde se sugere: 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	43
Figura 26 Principais etapas envolvidas na extração em fase sólida utilizando o cartucho de sílica gel.	46
Figura 27 Avaliação da eficiência da limpeza do cartucho de sílica gel na extração por fase sólida utilizando uma solução de tampão amoniacoal (pH=10) com n=1 na concentração de 100 µg mL ⁻¹ , onde TRA= triptamina, DMT= <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahidroharmina.	47
Figura 28 Valores de recuperação percentual para os alcaloides na concentração de 100 µg mL ⁻¹ após a etapa de extração utilizando o solvente água para o preparo das soluções padrão (n=1), onde TRA= triptamina, DMT= <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahidroharmina.	48
Figura 29 Cromatograma resultante dos alcaloides estudados após o processo de extração utilizando o cartucho de sílica, onde: 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.	48

Figura 30 Representação bidimensional da estrutura química da N4-Metil-Mentona Tiossemicarbazona.....	49
Figura 31 Cromatograma referente a análise do branco do método de extração proposto para os adsorventes sílica, biocarvão e SiMen(M)TSC, respectivamente.	53
Figura 32 Comparação da solução fortificada (A) com a solução livre dos alcaloides, sob condições cromatográficas listadas na Tabela 3, e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- <i>N,N</i> -dimetilriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.	57
Figura 33 Valores de concentração em g L^{-1} encontrados para os alcaloides utilizando o adsorvente sílica na bebida ayahuasca, onde: DMT= <i>N,N</i> -dimetilriptamina, HRO= harmalol, HRA=harmina, HRL=harmalina e THH=tetrahydroharmina.	65
Figura 34 Valores de concentração em g L^{-1} encontrados para os alcaloides, utilizando as três fases sólidas, na bebida ayahuasca, onde: DMT= <i>N,N</i> -dimetilriptamina, HRO= harmalol, HRA=harmina, HRL=harmalina e THH=tetrahydroharmina.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Propriedades físico-químicas dos alcaloides selecionados.	10
Tabela 2 Métodos para a determinação de triptaminas e β -carbolinas em ayahuasca. Fonte: adaptado de Gaujac, 2013 [3]......	13
Tabela 3 Condições operacionais de análise.....	18
Tabela 4 Composição da fase móvel empregando metanol e água com adição de solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico utilizando a coluna Zorbax com fluxo 1,5 mL min ⁻¹ , volume injetado de 20 μ L, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 80 Kgf cm ⁻²	19
Tabela 5 Dados de RMN de ¹ H da tetrahydroharmina sintetizada correlacionados com os dados da literatura [40]......	26
Tabela 6 Fases estacionárias utilizadas na otimização das condições de análise cromatográfica.	29
Tabela 7 Avaliação da eficiência dos sorventes utilizados na extração em fase sólida dos alcaloides (n=1) na concentração de 100 μ g mL ⁻¹ , onde: TRA= triptamina, DMT= N,N-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina.	44
Tabela 8 Avaliação da melhor condição de análise para os alcaloides por extração em fase utilizando o cartucho de sílica gel (n=1) na concentração de 100 μ g mL ⁻¹ , onde TRA= triptamina, DMT= N,N-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina.....	45
Tabela 9 Recuperação média (%) com coeficiente de variação (%) para eficiência (n=3) dos adsorventes alternativos utilizados na extração dos seis alcaloides avaliados na concentração de 100 μ g mL ⁻¹	51

Tabela 10 Regressão linear (n=3) da curva analítica e o coeficiente de correlação (R) para os três diferentes adsorventes analisados com os seis alcaloides avaliados no intervalo de concentração de 1 - 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$	55
Tabela 11 Recuperação média (n=3) com coeficiente de variação dos seis alcaloides avaliados com os três adsorventes avaliados em cinco níveis de fortificação.	59
Tabela 12 Precisão para o método desenvolvido (n=5) utilizando os três adsorventes analisados com os seis alcaloides avaliados na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	61
Tabela 13 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os três diferentes adsorventes analisados com os seis alcaloides avaliados.....	63

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Ayahuasca: Aspectos Gerais.....	1
1.2	Ayahuasca: Efeitos Fisiológicos e Potencial Terapêutico.....	2
1.3	Alcaloides	3
1.3.1	Biossíntese dos Alcaloides.....	4
1.4	Alcaloides selecionados para o estudo.....	8
1.5	Legislação	11
1.6	Revisão da literatura.....	11
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	Material.....	15
3.2	Reagentes	15
3.3	Padrões e soluções	15
3.3.1	Síntese da Tetrahydroharmina.....	16
3.3.2	Pureza Espectrofotométrica da Tetrahydroharmina.....	16
3.3.3	Ressonância Magnética Nuclear da Tetrahydroharmina.....	16
3.4	Equipamentos.....	17
3.5	Preparo das soluções padrão dos alcaloides	17
3.6	Condições cromatográficas de análise	17
3.7	Procedimento de extração por SPE.....	20
3.8	Procedência e obtenção da amostra de ayahuasca.....	20
3.9	Preparo da amostra de ayahuasca.....	23
3.10	Limpeza de vidraria	23

3.11	Descarte dos resíduos.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Alcaloides selecionados para o estudo.....	24
4.2	Caracterizações do alcaloide sintetizado Tetrahydroharmina	24
4.2.1	Espectroscopia de Absorção.....	24
4.2.2	Ponto de Fusão.....	24
4.2.3	Ressonância Magnética Nuclear.....	25
4.3	Otimização das condições cromatográficas	27
4.3.1	Seleção dos comprimentos de onda para determinação dos alcaloides por HPLC-DAD.....	27
4.3.2	Seleção da fase estacionária	29
4.3.3	Seleção e composição da fase móvel.....	36
4.4	Análise do branco do método cromatográfico	42
4.5	Otimização do procedimento de extração em fase sólida	43
4.5.1	Fases sólidas alternativas	49
4.6	Análise do branco do método de extração	52
4.7	Validação do método analítico.....	54
4.7.1	Linearidade e Sensibilidade	54
4.7.2	Seletividade.....	56
4.7.3	Exatidão	57
4.7.4	Precisão	60
4.7.5	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	62
4.8	Aplicação do método em amostras da bebida ayahuasca.....	64
5	CONCLUSÃO	67
6	PERSPECTIVAS DO TRABALHO	68
7	REFERÊNCIAS	69
8	APÊNDICES	76

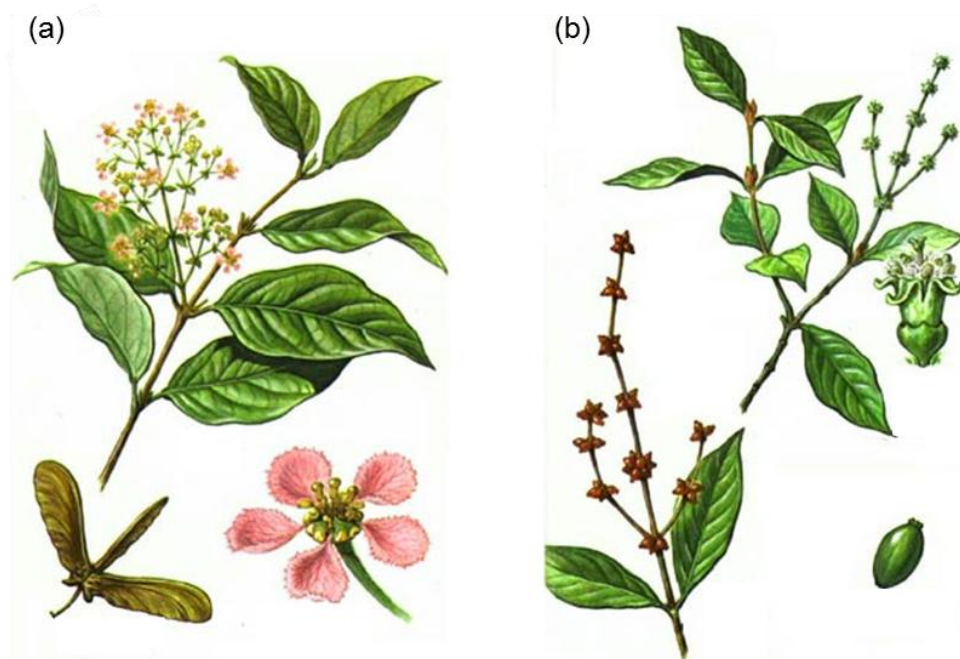
8.1	Apêndice 1	76
8.2	Apêndice 2.....	79
8.3	Apêndice 3.....	87
8.3.1	Curva Analítica para o adsorvente Sílica	87
8.3.2	Curva Analítica para o adsorvente Biocarvão	89
8.3.3	Curva Analítica para o adsorvente SiMen(M)TSC	91
8.4	Apêndice 4.....	93
8.4.1	Curva Analítica da Harmina para o grau de pureza espectrofotométrica da Tetrahydroharmina.....	93
8.4.2	Varredura na região UV-Vis para o padrão de Harmina com a Tetrahydroharmina sintetizada.....	93
8.4.3	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD-d_4) de tetrahydroharmina.	94
8.4.4	Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD-d_4) de tetrahydroharmina.	94

1 Introdução

1.1 Ayahuasca: Aspectos Gerais

Ayahuasca é uma bebida psicoativa composta por duas plantas: a *Banisteriopsis caapi* (a) e *Psychotria viridis* (b) (Figura 1) [1]. Esta bebida é amplamente utilizada há centenas de anos por tribos indígenas sul-americanas. Atualmente, o consumo está disseminado em todo o mundo, devido à expansão de cultos religiosos nos quais a ayahuasca é considerada um sacramento [2]. No Brasil, é difundida pela população indígena na Amazônia e desde os anos trinta passou a ser considerada como sacramento por alguns grupos religiosos brasileiros, incluindo o Santo Daime (Igreja do Culto Eclético da Fluente Luz Universal Patrono Sebastião Mota de Melo, ICEFLU) e a UDV (Centro Espírita Beneficente União do Vegetal).

Figura 1 Representação das plantas: a) *Banisteriopsis caapi* e b) *Psychotria viridis*. **Fonte:** http://www.santodaime.be/pt_historia_ayahuasca.html



Normalmente esta bebida (Figura 2) é preparada pela decocção de caules da *Banisteriopsis caapi*, que contêm os alcaloides β -carbólicos: harmalol (HRO), harmalina (HRL), harmina (HRA) e tetrahidroharmina (THH),

juntamente com folhas da *Psychotria viridis*, as quais contêm majoritariamente *N,N*-dimetiltriptamina (DMT) [3 - 5].

Figura 2 Bebida de ayahuasca produzida pela decocção das plantas *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*. Fonte: <https://www.culturaacriana.wordpress.com/>



Embora na literatura esteja estabelecido que o DMT apresenta forte efeito psicoativo [6], quando administrado oralmente sua atividade é inibida por uma enzima presente no trato digestivo, que é produzida no fígado, denominada monoamina oxidase (MAO) [7]. As β -carbolinas são potentes inibidores da MAO [8]. Logo, ao ingerir ayahuasca, a ação desta enzima é suprimida, o que potencializa os efeitos do DMT, afetando diretamente o sistema nervoso central (SNC) [1,7-9].

1.2 Ayahuasca: Efeitos Fisiológicos e Potencial Terapêutico

Os efeitos subjetivos são visão de imagens com os olhos fechados, delírios parecidos com sonhos e sensação de vigília e estimulação. É comum ocorrer hipertensão, palpitação, taquicardia, tremores, midríase, euforia e excitação agressiva. Náuseas, vômitos e diarreia são comuns e podem estar associadas à ação desses analitos com os receptores no SNC [10].

Winkelman (2014) desenvolveu um trabalho mostrando a recuperação de indivíduos que utilizavam álcool e outras drogas pela utilização da bebida no contexto religioso. Esses indivíduos mostravam-se ansiosos e com dificuldades emocionais, que foram substituídas pela relação com a Ayahuasca e com a

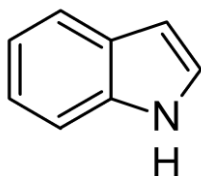
instituição religiosa [11]. Porém, mostram-se necessárias pesquisas científicas no sentido de tornar essa utilização segura para os adeptos e para que estes se conscientizem dos danos ao organismo que essas substâncias podem causar após a ingestão.

1.3 Alcaloides

De maneira geral, os alcaloides são metabólitos secundários que apresentam em sua constituição um ou mais átomos de N (nitrogênio), que contêm um par de elétrons não ligante, o qual confere caráter básico a esta classe de compostos orgânicos [12]. São encontrados principalmente em plantas e em menor proporção em microorganismos e animais [13].

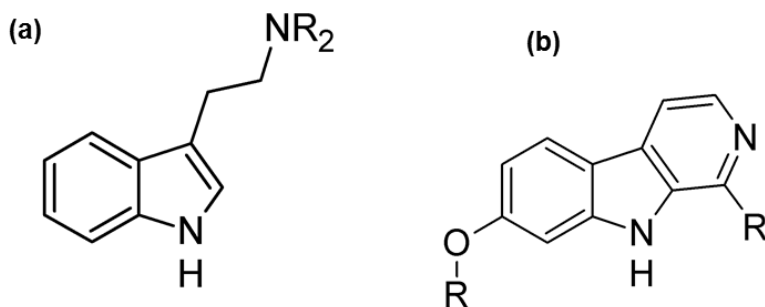
Dentre as diversas classes de alcaloides estudadas, encontram-se os indólicos. Estes compostos nitrogenados pertencem ao grupo dos “alcaloides verdadeiros”, pois possuem anel heterocíclico contendo um átomo de N e têm como precursor biossintético um aminoácido. Adotam este nome pela presença do grupo indol na cadeia principal (Figura 3).

Figura 3 Fórmula estrutural do grupo indol.



Na Figura 4 está representada a classe de compostos indólicos simples (a) e as β -carbolinas (b), ambos derivados do aminoácido Triptofano [14].

Figura 4 Fórmula estrutural básica dos alcaloides indólicos investigados: (a) simples e (b) β -carbolínicos.



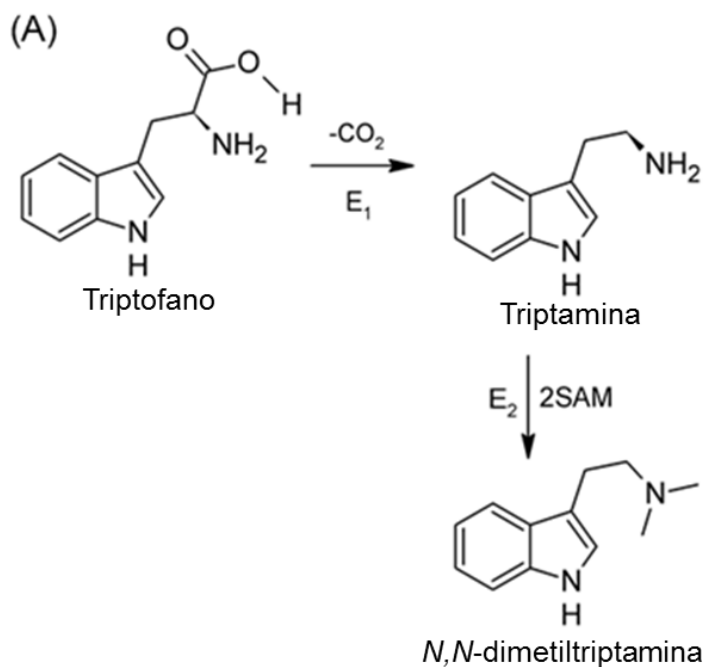
R = H, CH₃

Não raramente, diferentes atividades biológicas de algumas espécies de plantas estão associadas à presença majoritária destes compostos nos extratos obtidos das diferentes partes da matriz vegetal. Especialmente, atividades psicoativas [15, 16].

1.3.1 *Biossíntese dos Alcaloides*

Sabe-se, da literatura, que tanto os alcaloides indólicos mais simples quanto as β -carbolineas estão amplamente distribuídas em plantas. A triptamina e o DMT são biossintetizados a partir do Triptofano (um aminoácido aromático que tem sua origem na rota do chiquimato) através de uma reação de descarboxilação e posteriormente duas *N*-alquilações, reportado na Figura 5A e B [12].

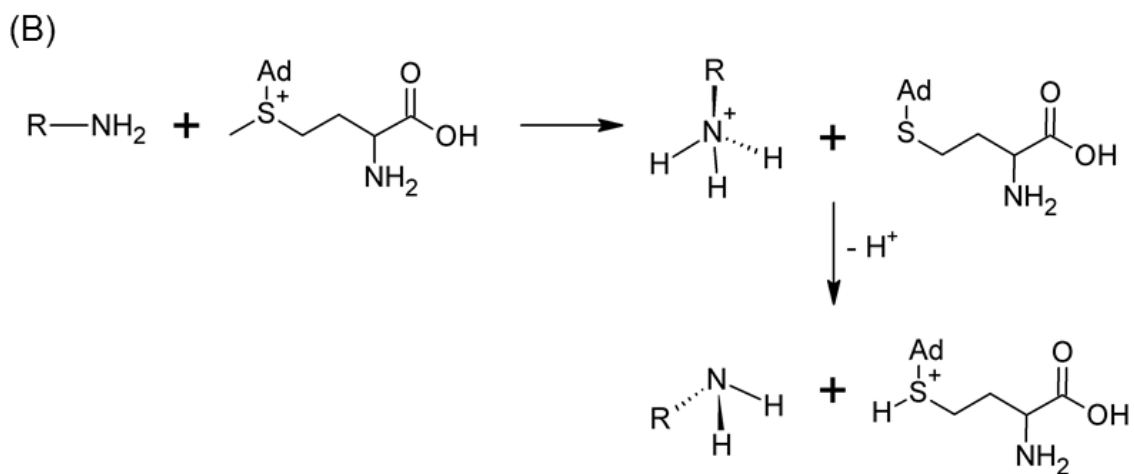
Figura 5 (A) Formação de Triptamina e DMT a partir do Triptofano e em (B) Etapas de *N*-alquilações utilizando SAM.



Onde: E_1 = Descarboxilase

E_2 = Amina *N*-metiltransferase

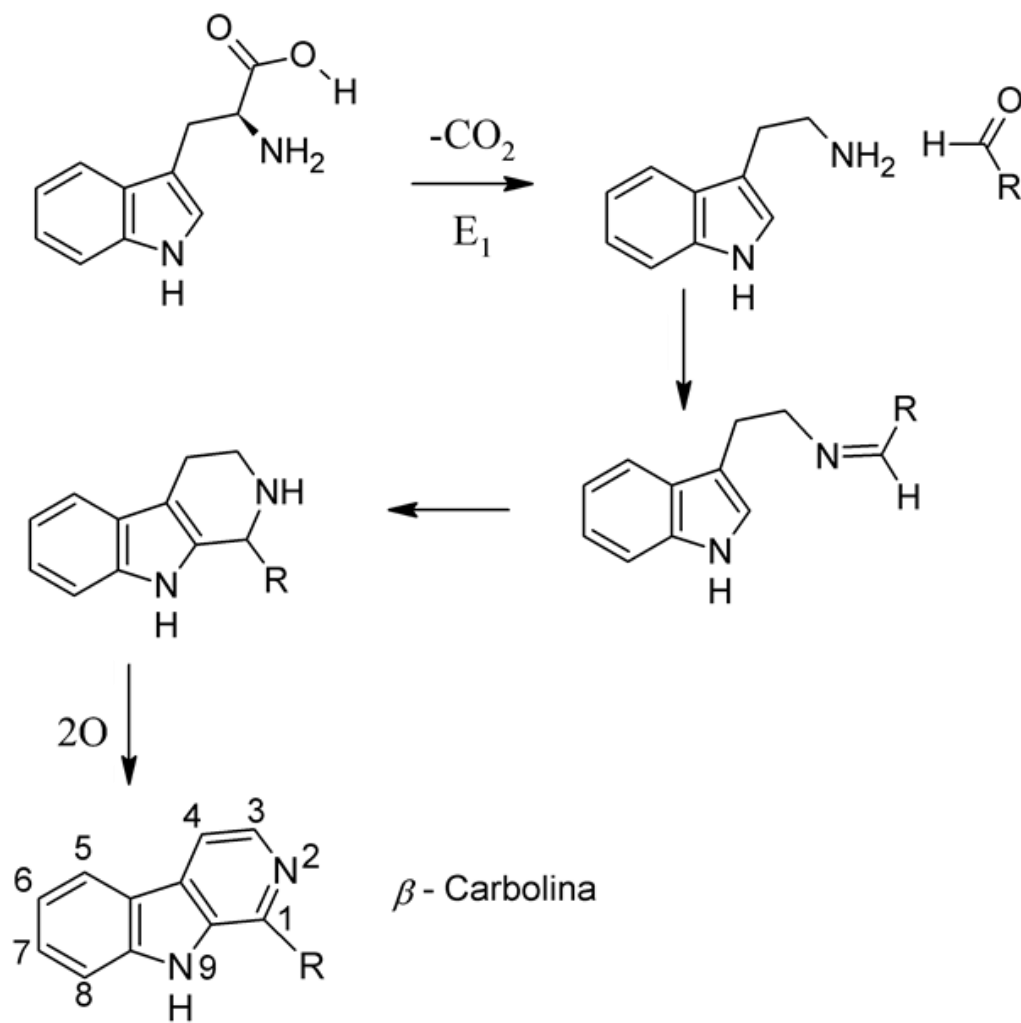
SAM = S-adenosilmetionina



Por sua vez, assim como o DMT, os alcaloides β -carbolínicos possuem como precursor o Triptofano, porém após a etapa de descarboxilação a amina resultante (triptamina) passa por uma reação de formação de imina (base de Schiff) na presença de um aldeído ou cetona e adicionalmente uma reação do tipo Mannich, na qual o carbono-alfa atua como nucleófilo, formando um anel heterocíclico de seis membros. Finalmente, após rearranjos de prótons e duas oxidações a estrutura das β -carbolinas está formada, sendo visualizada na Figura 6 [12, 13].

As estruturas das β -carbolinas como harmina, harmalina, tetrahydroharmina e harmalol incorporam à cadeia principal dois átomos de carbono extra, oriundos do cetoácido piruvato (Figura 6). A reação de substituição do grupo metóxi no átomo de carbono 7 do sistema indol ocorrem em algum estágio da rota biossintética por hidroxilação e posterior O-alquilação, enquanto que para o harmalol ocorre apenas hidroxilação.

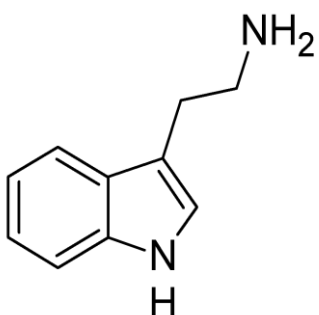
Figura 6 Biossíntese dos alcaloides simples β -carbolínicos via reações de descarboxilação, imina e Mannich, respectivamente.



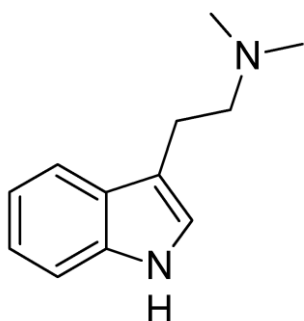
1.4 Alcaloides selecionados para o estudo

As concentrações de metabólitos secundários, tais como os alcaloides em plantas podem variar significativamente para uma mesma espécie, dependendo da região onde esta esteja localizada, devido a fatores como clima, solo, relevo e obviamente predadores naturais [17]. As propriedades físico-químicas dos alcaloides selecionados para esse estudo estão apresentadas na Tabela 1 e as fórmulas estruturais na Figura 7.

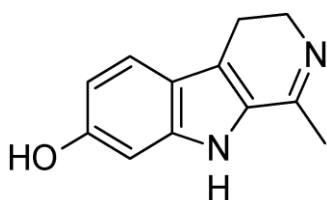
Figura 7 Fórmula estrutural dos alcaloides.



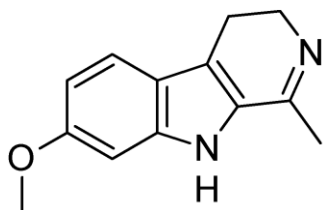
Triptamina [nome sistemático IUPAC 2-(1*H*-Indol-3-il)etanamina]. Metabólito secundário monoamínico derivado do triptofano encontrado em plantas e animais.



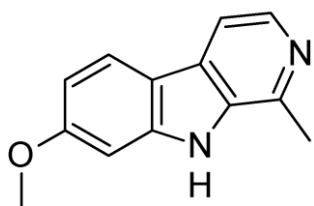
N,N-dimetiltriptamina (nome sistemático IUPAC 2-(1*H*-Indol-3-il)-N, N-dimetiletanamina). Molécula com atividade serotoalucinogênica comprovada, atuando como agonista a alguns receptores da serotonina. Sua ação no organismo é inibida ao sofrer oxidação no sítio ativo da enzima MAO. Pode ser encontrada em diversas plantas, especialmente *Prestonia amazônica* (*Apocynaceae*) e *Psychotria viridis* [18].



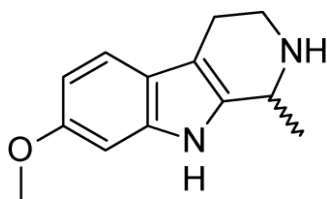
Harmalol (nome IUPAC: 1-metil-4,9-dihidro-3*H*- β -carbolin-7-ol). Alcaloide β -carbolínico simples presente em plantas da família *Banisteria caapi*. Assim como os demais alcaloides β -carbolínicos simples relatados acima, é classificado como MAO inibidor [18].



Harmalina (nome IUPAC: 7-metoxi-1-metil-4,9-dihidro-3*H*- β -carbolina). Alcaloide β -carbólico simples presente em plantas da família *Banisteria caapi*. Inibidor da enzima MAO. Este metabólito secundário também pode ser extraído de sementes da *Peganum harmala* [18].



Harmina (nome IUPAC: 7-metoxi-1-metil-9*H*- β -carbolina). Alcaloide β -carbólico simples presente em plantas da família *Banisteria caapi*. Possui atividade de inibir a enzima MAO e por este motivo desde meados dos anos vinte reporta-se seu uso terapêutico contra a doença de Parkinson [18].



Tetrahydroharmina (nome IUPAC: 7-metoxi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1*H*- β -carbolina). Embora possua ocorrência natural, pode ser sintetizado em laboratório *via* reação de redução do cloreto de harmalina diidratado. A literatura o classifica como espécie inibidora da enzima MAO [18].

Tabela 1 Propriedades físico-químicas dos alcaloides selecionados.

Alcaloide	Fórmula Molecular	Massa molar (g mol ⁻¹)	Ponto de Fusão (°C)	pKa ₁ *	pKa ₂ *
Triptamina	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160,22	113 – 116	9,1	17,2
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	188,27	40	9,5	17,2
Harmalol	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O	200,24	100 – 105	7,9	15,9
Harmalina	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O	214,26	232 – 234	7,9	14,9
Harmina	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	212,25	321	6,1	13,5
Tetrahydroharmina	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O	216,28	199	9,1	16,3

*Dados disponíveis em <http://www.chemicalize.org/>[18].

1.5 Legislação

O consumo de ayahuasca no Brasil segue parâmetros legais dispostos na Resolução nº 1/2010 do CONAD (Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas), a qual estabelece que a bebida deve ser utilizada apenas para fins religiosos [2-19], uma vez que o DMT presente na bebida é considerado uma droga proscrita no país [2].

Dessa forma, o Documento Outorgante nº 1 do CONAD, de 26 de Janeiro de 2010, ressalta que é imprescindível uma investigação mais detalhada, no âmbito científico, a fim de melhor caracterização dos constituintes da bebida, uma vez que existem pesquisas que defendem o uso da ayahuasca para o tratamento de doenças psicomotoras, tal qual a doença de Parkinson [20, 21], ou a aplicação terapêutica para tratamento de pacientes dependentes de álcool e de outras drogas altamente aditivas, como cocaína e heroína [22].

Dessa maneira, pesquisas que visem tanto quantificação quanto caracterização físico-química desses metabolitos em amostras de ayahuasca, irão contribuir como base de dados para pesquisadores e consumidores da bebida [19].

Logo, se faz necessário o desenvolvimento de métodos analíticos que atendam esta demanda com relação a um conhecimento mais detalhado da composição desta bebida.

1.6 Revisão da literatura

A constatação das propriedades psicoativas do DMT [3, 6] e a possibilidade de aplicação terapêutica dos alcaloides β - carbolínicos [20, 21] têm despertado o interesse da comunidade científica no que concerne ao desenvolvimento de métodos que visem à extração e quantificação destes compostos em diversas matrizes [5, 23], aplicações em ensaios biológicos de inibição de enzimas [24] e avaliações toxicológicas [25].

Riba *et al.*, 2012, verificaram a existência de rotas metabólicas alternativas para o DMT em humano (além da biotransformação pela MAO-A), após análise de 24 amostras de urina em sistema analítico de HPLC/ESI/MS [26].

Stanković *et al.*, 2015, determinaram as β -carbolinas harmina e harmalol presentes na urina por voltametria de pulso diferencial, o qual permitiu a quantificação desses compostos nas faixas de concentração de 1-50 e 1-75 μM , com limites de detecção entre 0,6 e 0,2 μM , respectivamente [27].

Gaujac *et al.*, 2013, caracterizaram DMT isolado de cascas da planta *Mimosa tenuiflora* via FTIR, MS, RMN (^1H e ^{13}C) e ponto de fusão, para ser utilizado como padrão analítico em sistema GC/MS/MS [5].

Efeitos neurotóxicos agudos da ayahuasca foram investigados por Pic-Taylor *et al.*, 2015, em ratas Wistar durante 14 dias. Os animais tratados com doses não superiores a 15,1 mg Kg^{-1} pc apresentaram decréscimo na capacidade locomotora em campo aberto. Alterações permanentes no cérebro dos animais não foram identificadas. A capacidade antidepressiva da bebida foi sugerida pelos autores [25].

Ainda que muitas referências sobre ayahuasca estejam disponíveis na literatura, até o momento, poucos são os trabalhos que fazem menção ao desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de alcaloides indólicos em amostras de ayahuasca como pode ser observado na Tabela 2.

Nesse contexto, o Prof. Dr. Alain Gaujac, do Instituto Federal de Sergipe (IFS), desenvolveu nos últimos três anos, quatro relevantes artigos [1, 5, 28, 29] e uma revisão [3] sobre os aspectos qualitativos e quantitativos do alcaloide *N*, *N*-dimetiltriptamina. Assim, em parceria com o grupo GAPO, do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP), no Departamento de Química (DQI), na Universidade Federal de Sergipe (UFS), pretende-se com este trabalho o desenvolvimento de método analítico para determinação dos alcaloides indólicos triptamina, *N*, *N* – dimetiltriptamina, harmalol, harmalina, harmina e tetrahidroharmina em amostras de ayahuasca, utilizando as técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e de extração em fase sólida.

Tabela 2 Métodos para a determinação de triptaminas e β -carbolinas em ayahuasca. **Fonte:** adaptado de Gaujac, 2013 [3].

Referência	Callaway, 2005 [30]	Huhn <i>et al.</i> , 2005 [31]	Gambelunghe , 2008 [32]	Pires <i>et al.</i> , 2009 [33]	McIlhenny <i>et al.</i> , 2009 [34]	Moura <i>et al.</i> , 2010 [35]	Gaujac <i>et al.</i> , 2013 [1]
Analitos	DMT, Harmina, Harmalina e THH.	DMT, Norharmano, Harmano, Harmina, Harmalina Harmol e THH	DMT, Harmina e Harmalina	DMT, Harmina, Harmalina e THH	DMT, NMT, Harmalol, Harmina, Harmalina e THH	DMT	DMT
Método de preparo de amostras	LLE/ DMT; β - carbolinas/ diluição do extrato na fase móvel.	Amostras diluídas em tampão	Extração com éter etílico e centrifugação	SPE	Diluição na fase móvel	LLE	SPME
Técnica de separação/ detecção	DMT/ GC/NPD; β - carbolinas/ HPLC - FL.	CE-LIF- ESI-MS	GC - MS	GC - NPD	HPLC- MS/MS	qRMN	GC-IT- MS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia para determinação de alcaloides indólicos em amostras de ayahuasca, utilizando as técnicas de extração em fase sólida (SPE) e cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos (HPLC-DAD).

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Selecionar os alcaloides;
- ✓ Obter as condições críticas para a análise dos alcaloides por HPLC-DAD;
- ✓ Desenvolver metodologia para o preparo analítico de amostras de ayahuasca por SPE;
- ✓ Validar a metodologia analítica;
- ✓ Avaliar a eficiência de fases alternativas frente à fase comercial;
- ✓ Aplicar a metodologia desenvolvida em amostras de ayahuasca.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

Béquer (50 e 100 mL), balão volumétrico (1;2;5;10;25 e 50 mL), proveta (250 e 500 mL), frascos (1 e 10 mL), balão de fundo redondo (50 mL), micropipetas de volumes 100-1000 μ L (Boeco Pipette), vidro de relógio, bastão de vidro, espátula, seringa de vidro, pipeta Pasteur, filtro seringa (0,22 μ m-Nylon) e funil de separação.

3.2 Reagentes

Os reagentes empregados na preparação e na análise das soluções padrão e das amostras foram acetonitrila e metanol grau HPLC adquiridos da Tedia (Fairfield, OH, EUA); cartuchos para extração em fase sólida de C₁₈ (Agilent Technologies, EUA), Florisil® (100-200 Mesh; J. T. Baker, Philipsburg, NJ, EUA), DSC/SAX (Sigma-Aldrich, EUA), SAX/PSA (Sigma-Aldrich, EUA) e sílica (Vetec, RJ, Brasil); hidróxido de sódio e ácido fórmico adquiridos da T. T. Baker (EUA); ácido clorídrico adquirido da Sigma-Aldrich, EUA; tampão amoniacal (pH=10) preparado a partir dos sais adquirido da Dinâmica (SP, Brasil).

3.3 Padrões e soluções

Foram utilizados padrões certificados dos alcaloides triptamina, harmalol, harmina e harmalina, adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA), com pureza superior a 95%.

N,N-dimetilriptamina (pureza>95%) foi isolado das cascas de *Mimosa tenuiflora* de acordo com procedimento descrito em Gaujac *et al.*, 2012 [5].

O padrão de Tetrahidroharmina foi preparado a partir da reação de redução do sal de harmalina segundo metodologia descrita por Begum, 1984 [36], obtendo-se um grau de pureza de 98,2%.

3.3.1 Síntese da Tetrahydroharmina

Para a síntese da tetrahydroharmina foi seguido um procedimento descrito na literatura [36], 100 mg do sal de harmalina (dicloreto de harmalina dihidratado) foram dissolvidos em solução aquosa de HCl a 10% (v/v) sob aquecimento, resultando em uma solução de cor amarela. Promove-se a reação de hidrogenação após adição de quantidades de $Zn_{(s)}$ em pó, deixando por seguinte o sistema em constante agitação por 4h. Evidencia-se qualitativamente o término da reação quando a solução torna-se incolor. A partir deste ponto, o pH do meio é alcalinizado com adição de gotas de NH_4OH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Uma extração líquido-líquido com 30 mL de acetato de etila é realizada utilizando para tal três etapas extrativas de 10mL. A tetrahydroharmina é precipitada na forma de um sólido branco.

3.3.2 Pureza Espectrofotométrica da Tetrahydroharmina

Para o teste de pureza espectrofotométrica uma curva analítica ($n = 5$) de absorção *versus* concentração do padrão de harmina ($0,01 - 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$) foi construída através de análises no espectrofotômetro de UV-Vis Cary 100 Scann, em modo fotométrico no comprimento de onda 326 nm [37]. A leitura da solução de tetrahydroharmina ($n = 3$) de concentração $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ foi conduzida em 296 nm [38]. O calculo de obtenção da absorção teórica da tetrahydroharmina foi realizado a partir da curva construída para o padrão de harmina (apêndice 4).

3.3.3 Ressonância Magnética Nuclear da Tetrahydroharmina

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensionais (1D) foi realizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em colaboração com o Prof. Dr. Andersson Barison registrados em aparelhos Bruker Avance III DRX- 400 operando a 9.4 Tesla, observando o núcleo de 1H a 400 MHz e o núcleo de ^{13}C a 100 MHz. A amostra foi solubilizada em clorofórmio e gotas de metanol deuterados ($CDCl_3 + MeOD-d_4$) utilizando o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência. Os

deslocamentos químicos estão expressos em ppm (δ), as constantes de acoplamento (J) foram registrados em Hertz (Hz) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), *dd* (duplo duplete), *ddd* (duplo duplo duplete) e *dddd* (duplo duplo duplo duplete).

3.4 Equipamentos

Balança analítica (Sartorius TE214S), sistema para SPE Vacuum Manifold (Varian, Walnut Creek, CA, EUA), cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector espectrofotométrico com arranjo de diodos modelo Prominence (Shimadzu, Quioto, Japão), sistema de ultrapurificação Milli-Q SP Reagent Water System (Millipore, Bedford, MA, EUA), Vortex 1(IKA[®]) e estufa de secagem e esterilização TE-393/1 (Tecnal, Piracicaca, SP).

3.5 Preparo das soluções padrão dos alcaloides

Para preparação das soluções padrão estoque dos seis alcaloides, foram pesados separadamente 10 mg de cada padrão analítico e transferidos para balões volumétricos de 5 mL. O volume de cada balão foi completado com metanol dando origem a uma solução de 2 mg mL⁻¹.

A partir da solução padrão inicial de 2 mg mL⁻¹, foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 0,001, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,02, 0,025 e 0,30 mg mL⁻¹. As soluções padrão de trabalho dos alcaloides foram utilizadas para obtenção das curvas analíticas e para o procedimento de extração em fase sólida dos alcaloides. O tempo de utilização das soluções padrão foi estimado em dois meses.

3.6 Condições cromatográficas de análise

As condições cromatográficas de análise foram otimizadas em um cromatógrafo líquido modelo *Prominence* da marca Shimadzu (Quioto, Japão) constituído pelos seguintes módulos: desgaseificador (modelo DGU-20A₃), detector UV-Visível com arranjo de fotodiodos (modelo SPD-M20A), sistema binário de bombeamento (modelo LC-20AT), injetor automático (modelo SIL-

20A), módulo forno de coluna (modelo SPD-M20A) e um módulo de comunicação (CBM-20A), utilizando uma coluna analítica Zorbax 5 μ Eclipse Plus C8 (150 x 4,6 nm), conectada a uma coluna de guarda com mesmas características, marca Agilent (EUA) e software de gerenciamento *LCSolution*. As condições ótimas de operação do cromatógrafo para a análise dos seis alcaloides por cromatografia líquida de alta eficiência estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 3 Condições operacionais de análise.

Condições Operacionais		
Coluna de aço inoxidável (150 x 4,6 mm d.i., 5 μ m)	Agilent	
Coluna de guarda de aço inoxidável (5 μ m)	Agilent	
Volume injetado (μ L)	20	
Temperatura da coluna ($^{\circ}$ C)	30	
Pressão no sistema cromatográfico (Kgf cm $^{-2}$)	80	
Modo de detecção	DAD	
Comprimento de onda (nm):		
Triptamina	278	
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	278	
Harmalol	372	
Harmalina	372	
Harmina	246	
Tetrahydroharmina	320	
Fluxo (mL min $^{-1}$)	1,5	
Fase móvel (modo gradiente):	Metanol/Água	com
	adição de solução	
	aquosa de 0,1% de ácido	
	fórmico	

Tabela 4 Composição da fase móvel empregando metanol e água com adição de solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico utilizando a coluna Zorbax com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume injetado de $20 \text{ }\mu\text{L}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 80 Kgf cm^{-2} .

Tempo (min)	Metanol (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,5	93,8
4	6,6	93,6
6	6,7	93,3
7	6,8	93,2
8	6,9	93,1
10	7,0	93,0
11	7,4	92,6
12	7,8	92,2
13	8,0	92,0
14	8,5	91,5
15	9,0	91,0
16	10,0	90,0
18	15,0	85,0
19	17,0	83,0
22	20,0	80,0
27	40,0	60,0
30	50,0	50,0
35	5,0	95,0
40	5,0	95,0

3.7 Procedimento de extração por SPE

Para o procedimento de otimização da extração em fase sólida foi elevado o pH das soluções padrão dos analitos na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de pH = 6 para pH = 8 com adição de 1 mL de solução padrão de NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Dessa maneira, para realização dos experimentos de extração em fase sólida foi utilizada uma solução padrão alcalinizada durante os testes.

Na realização dos experimentos de extração em fase sólida os cartuchos foram condicionados com 4 mL de metanol e 4 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, foi realizada a passagem de 20 mL da amostra pelo cartucho, deixando secar por 5 minutos sob vácuo. A eluição dos analitos foi realizada com 3 mL de metanol (pH=3) para os adsorventes sílica e SiMen(M)TSC, enquanto que para o adsorvente biocarvão a eluição dos analitos foi realizada com 6 mL de metanol (pH=3). O eluato foi concentrado a aproximadamente 1 mL em fluxo de nitrogênio. Por fim, o extrato foi filtrado em filtro seringa ($0,22 \mu\text{m}$ – Nylon) e uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ foi analisada por HPLC-DAD.

3.8 Procedência e obtenção da amostra de ayahuasca

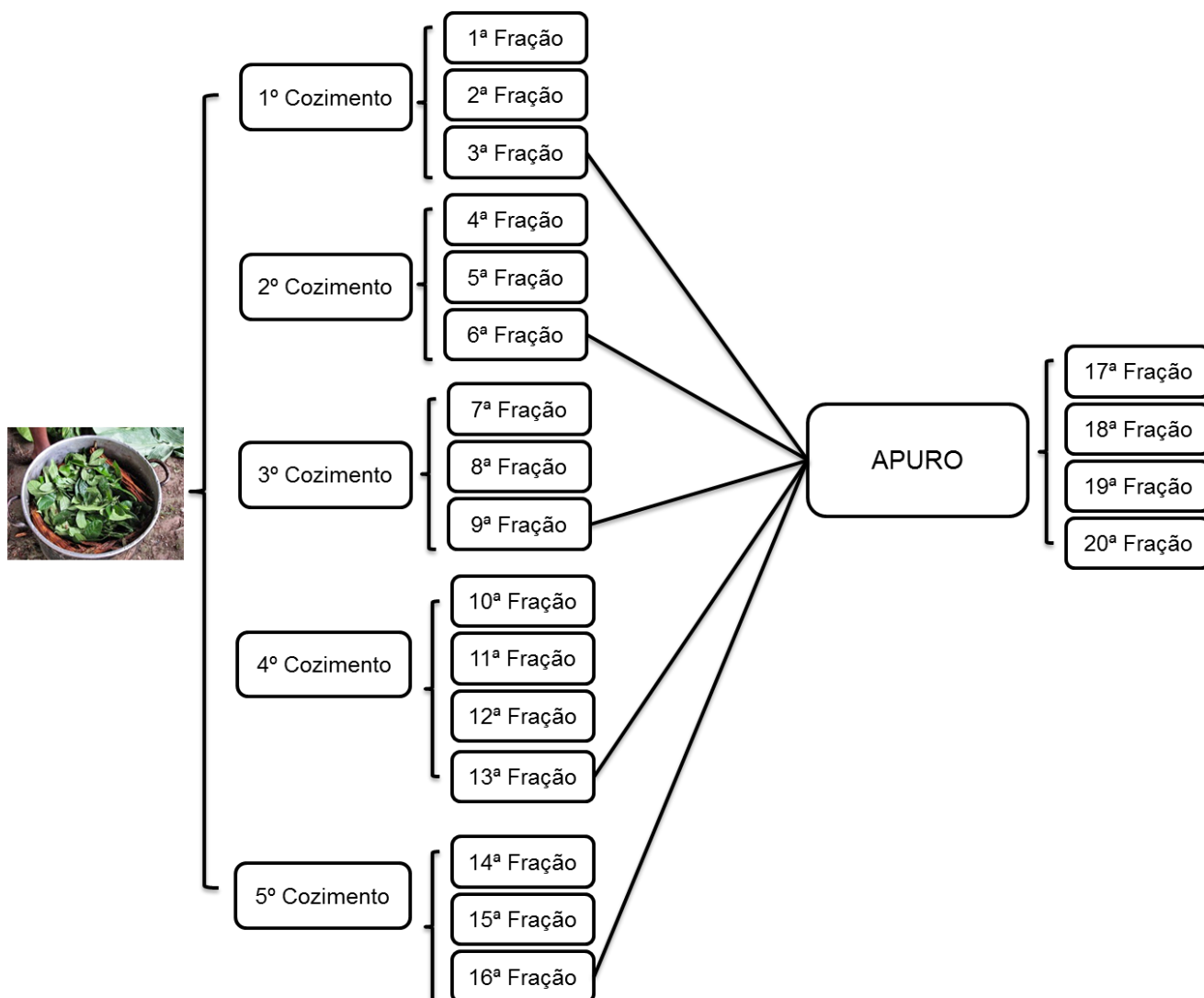
As amostras da bebida ayahuasca analisadas pelo método otimizado foram coletadas em centro religioso proveniente da cidade Fortaleza/CE (Figura 8).

Figura 8 Imagem das amostras da bebida ayahuasca coletadas em centro religioso proveniente da cidade Fortaleza/CE.



Para obtenção dessas amostras de ayahuasca o centro religioso faz o cozimento das plantas que constituem a bebida. As plantas são submetidas à fervura e são coletadas alíquotas da bebida a cada hora de cozimento. No entanto, a cada três horas de cozimento é retirada uma fração e armazenada. Em seguida, é feita adição de mais água no recipiente contendo as plantas e continua o processo de cozimento, seguindo esse mesmo procedimento durante dezesseis horas. Transcorrido esse tempo é adicionado todo material que fora armazenado e segue um novo cozimento. Esse novo cozimento recebe a denominação “apuro”. Assim, a cada hora de cozimento do apuro é novamente retirado uma fração (Figura 9).

Figura 9 Ilustração do preparo da bebida ayahuasca em centro religioso na cidade de Fortaleza/CE.



Ao final do procedimento foram obtidas 20 frações, sendo que para esse centro religioso na cidade de Fortaleza/CE, o apuro é considerado a bebida ayahuasca. Essas amostras foram guardadas em freezer, após a chegada ao laboratório, para posterior análise.

3.9 Preparo da amostra de ayahuasca

O preparo da amostra constituiu na agitação de cada frasco garantindo uma melhor homogeneização da bebida que continha os particulados em suspensão. Em seguida, das frações 1 a 16 de ayahuasca passaram por metodologia descrita anteriormente no procedimento de extração por SPE. No entanto, devido a característica viscosa do apuro, para as frações de 17 a 20 foi realizada uma diluição de 1:100 (v/v). Em seguida, foi realizado o procedimento de extração por SPE, conforme as condições otimizadas de análise. Por fim, todas as amostras foram analisadas através do sistema cromatográfico HPLC-DAD.

3.10 Limpeza de vidraria

A limpeza das vidrarias utilizadas na preparação das soluções padrão e no procedimento de extração consistiu em deixar de molho em detergente neutro por 24 horas. Em seguida, foi enxaguada em água corrente para retirar o excesso de detergente e depois enxaguada com água destilada para finalmente serem secas com acetona para posterior evaporação ao ar. As vidrarias não graduadas foram secas em estufa. Após a secagem, as vidrarias foram vedadas com papel filme e guardadas em armário.

3.11 Descarte dos resíduos

Para o descarte dos resíduos dos experimentos foram utilizados recipientes de polietileno devidamente identificados. Estes recipientes contendo os resíduos são levadas para um abrigo temporário e em seguida coletadas por uma empresa prestadora de serviço para destinação correta e segura destes resíduos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Alcaloides selecionados para o estudo

A escolha dos alcaloides triptamina, *N,N*-dimetiltriptamina, harmalol, harmina, harmalina e tetrahydroharmina para o desenvolvimento deste trabalho se baseou na presença majoritária destes nas amostras de ayahuasca, bem como na capacidade inibitória das β -carbolinas sobre a enzima MAO-A que resultaria numa acentuação dos efeitos do DMT no SNC [3, 39].

4.2 Caracterizações do alcaloide sintetizado Tetrahydroharmina

4.2.1 Espectroscopia de Absorção

Para a determinação espectrofotométrica do grau de pureza foi construído uma curva analítica (absorção *versus* concentração) na faixa de concentração de 0,01- 0,1 mmol L⁻¹, para o padrão de harmina (n=5) apresentando um bom coeficiente de correlação (R=0,9996). Em virtude, da igualdade das absorvidades molares (ϵ) entre harmina (326 nm) [37] e tetrahydroharmina (296 nm) [38] a partir da equação da reta encontrada para harmina foi possível calcular os valores para a absorção teórica da THH. O valor de absorção experimental (n=3) encontrado resultou em 98,2 % do teórico (Apêndice 4).

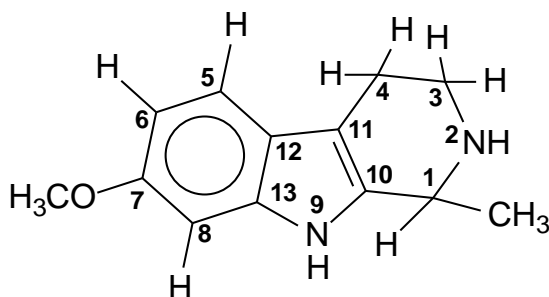
4.2.2 Ponto de Fusão

Foi analisado o ponto de fusão desse sólido branco, sendo encontrado o valor médio (n=3) de 199,3 \pm 0,2 °C, corroborando o valor da literatura para a tetrahydroharmina de 199 °C [36].

4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

Tetrahidroharmina (Figura 10): sólido branco; identificado através dos experimentos de ^1H , ^{13}C e, por sua vez, comparado com os dados da literatura [40]. Os valores de deslocamentos químicos observados pelo espectro de RMN de ^1H 400 MHz, 303 K, CDCl_3 + gotas de $\text{MeOD-}d_4$ (δ em ppm e J em Hz) foram: 4,15 (1H; qdd ; 6,7; 2,1; 1,8; H-1); 1,45 (3H; d ; 6,7; 1- CH_3); 3,01 (1H; ddd ; 12,9; 8,9; 5,2; H-3a); 3,33 (1H; ddd ; 12,9; 5,3; 5,2; H-3b); 2,73 (1H; $dddd$; 15,5; 5,2; 3,7; 1,8; H-4a); 2,76 (1H; $dddd$; 15,5; 8,9; 5,3; 2,1; H-4b); 7,34 (1H; d ; 8,6; H-5); 6,74 (1H; dd ; 8,6; 2,2; H-6); 3,84 (3H; s ; 7- OCH_3) e 6,86 (1H; d ; 2,2; H-8) e pelo espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, 303 K, CDCl_3 + gotas de $\text{MeOD-}d_4$) δ (ppm): 156,1 (C-7); 136,7 (C-8); 135,5 (C-10); 121,9 (C-12); 118,5 (C-5); 108,6 (C-6); 107,4 (C-11); 95,4 (C-8); 56,4 (7- OCH_3); 48,4 (C-1); 42,5 (C-3); 22,3 (C-4); 20,1 (1- CH_3) [Apêndice 4].

Figura 10 Fórmula estrutural da tetrahidroharmina



Os valores de deslocamento encontrados para o próton ^1H estão de acordo com os valores reportados por Wu *et al.*, 2013 [40], mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 Dados de RMN de ^1H da tetrahydroharmina sintetizada correlacionados com os dados da literatura [40].

Posição	Tetrahydroharmina	Tetrahydroharmina [40]
	δ_{H} mult. (J em Hz) ^a	δ_{H} mult. (J em Hz) ^b
1 -CH ₃	1,45 (3H; <i>d</i> ; 6,7)	1,44 (3H, <i>d</i> , 6,4)
1	4,15 (1H; <i>qdd</i> ; 6,7; 2,1; 1,8)	4,15 (1H, <i>q</i> , 6,6)
3 _{pax}	3,01 (1H; <i>ddd</i> ; 12,9; 8,9; 5,2)	3,04 (1H, <i>ddd</i> , 13,1; 8,5; 4,9)
3 _{peq}	3,33 (1H; <i>ddd</i> ; 12,9; 5,3; 5,2)	3,36 (1H, <i>dt</i> , 12,8, 4,2)
4 _{pax}	2,76 (1H; <i>dddd</i> ; 15,5; 8,9; 5,3; 2,1)	2,78-2,66 (2H <i>m</i>)
4 _{peq}	2,73 (1H; <i>dddd</i> ; 15,5; 5,2; 3,7; 1,8)	
5	7,34 (1H; <i>d</i> ; 8,6)	7,35 (1H, <i>d</i> , 8,4)
6	6,74 (1H; <i>dd</i> ; 8,6; 2,2)	6,77 (1H, <i>dd</i> , 8,4; 1,6)
7 -OCH ₃	3,84 (3H, <i>s</i>)	3,83 (3H, <i>s</i>)
8	6,86 (1H; <i>d</i> ; 2,2)	6,83 (1H, <i>d</i> , 1,2)

^a O experimento foi realizado a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 + gotas de $\text{MeOD}-d_4$, utilizando o TMS como padrão referência. ^b Dados da literatura de acordo com Wu et al, 2013 (400 MHz; CDCl_3 , 300K). *pax= pseudoaxial e *peq= pseudoequatorial (δ) Deslocamento químico em ppm..

4.3 Otimização das condições cromatográficas

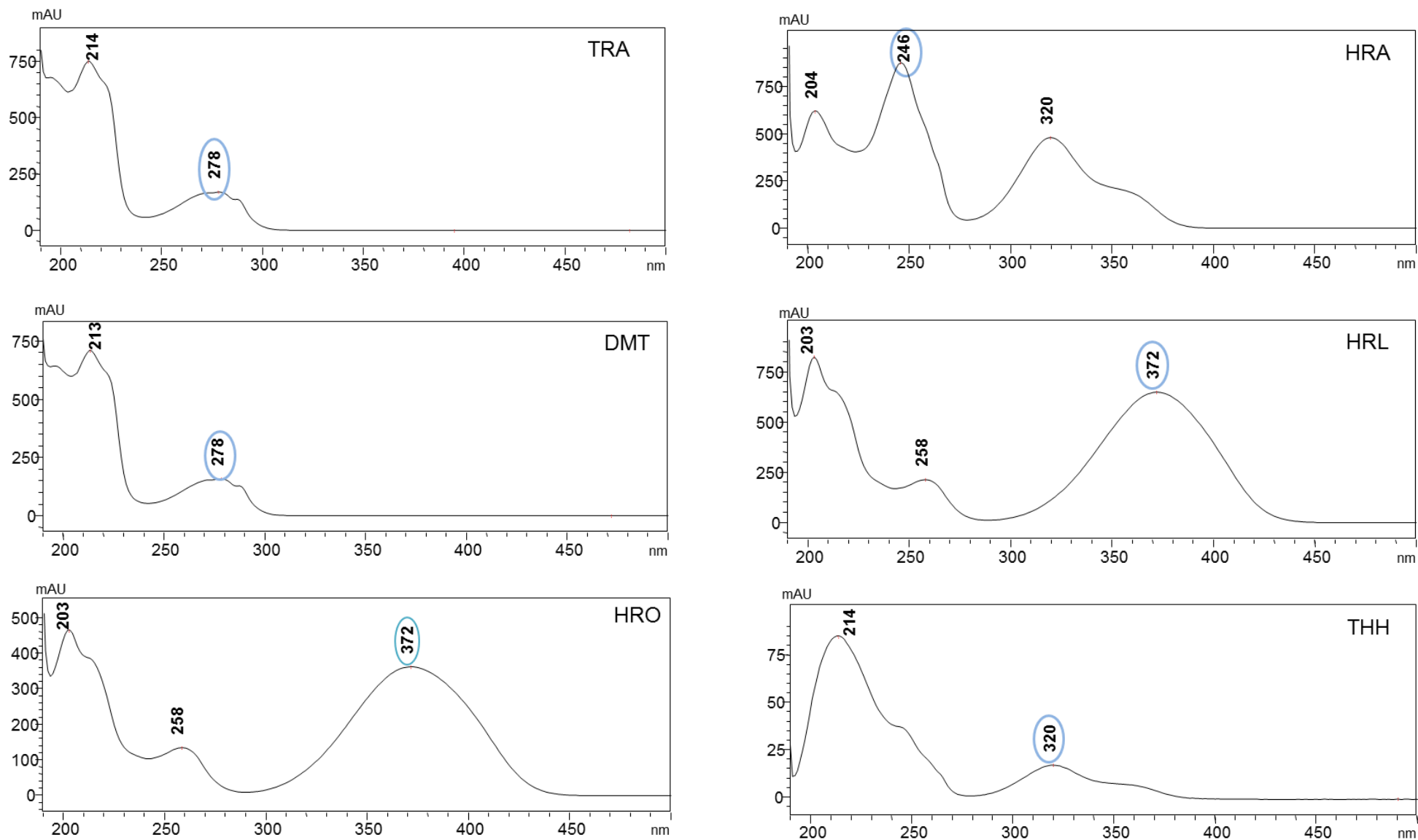
Diversos fatores influenciam o processo de separação em cromatografia líquida. Dentre eles destacam-se a composição da fase estacionária e da fase móvel, bem como o modo de eluição [34]. Assim, nesse trabalho foram avaliados alguns desses fatores.

4.3.1 Seleção dos comprimentos de onda para determinação dos alcaloides por HPLC-DAD

Foi verificada a partir da fórmula estrutural dos analitos a presença de grupos cromóforos C=N, C-N, C-O e ligações duplas C=C em anéis aromáticos. Desta maneira, os compostos foram individualmente submetidos a varredura espectrofotométrica nas regiões ultravioleta e visível, utilizando cromatógrafo líquido com detector de arranjo de diodos [41].

A Figura 11 apresenta os espectros de absorção adquiridos para cada alcaloide após a varredura fornecendo os comprimentos de onda de absorção para cada alcaloide.

Figura 11 Espectros de absorção dos alcaloides utilizando cromatógrafo líquido com detector de arranjo de fotodiodos, onde TRA = triptamina, DMT= *N, N*-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina.



É possível notar a presença de uma banda intensa de absorção na faixa de 203 - 214 nm nos espectros de absorção dos alcaloides, que está próxima à banda de absorção do solvente metanol [42]. Dessa forma, para não comprometer a análise, após a aquisição dos espectros de absorção dos analitos os comprimentos de onda selecionados foram: triptamina (278 nm); *N,N*-dime-tiltriptamina (278 nm); harmalol (372 nm); harmina (246 nm); harmalina (372 nm) e tetrahidroharmina (320 nm).

4.3.2 Seleção da fase estacionária

Para a investigação da melhor fase estacionária, colunas cromatográficas com fases quimicamente ligadas [35] foram utilizadas na separação dos seis analitos. A Tabela 6 apresenta as especificações das colunas cromatográficas utilizadas nesse trabalho.

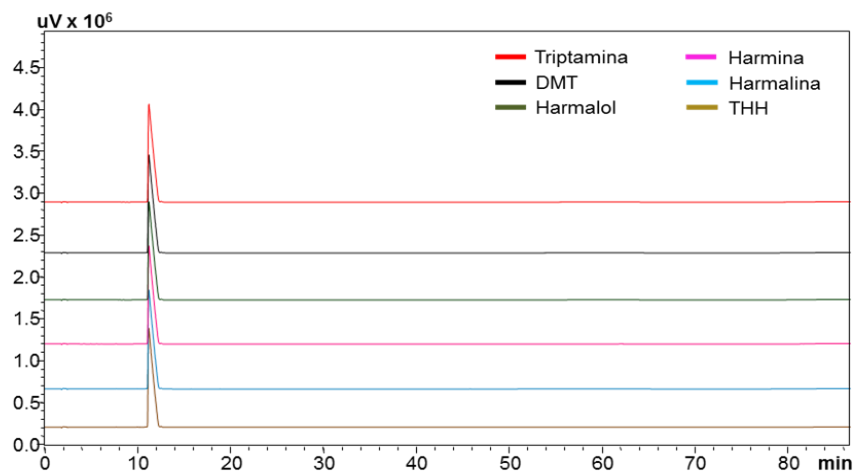
Tabela 6 Fases estacionárias utilizadas na otimização das condições de análise cromatográfica.

Coluna Cromatográfica	Tamanho de poro (°A)	Diâmetro de partícula (µm)	Dimensão da coluna	Marca
Kinetex	100	2,6	150x4,6 mm	Phenomenex
Luna Hilic	200	5	150x4,6 mm	Phenomenex
Zorbax Eclipse Plus	95	5	150x4,6 mm	Agilent

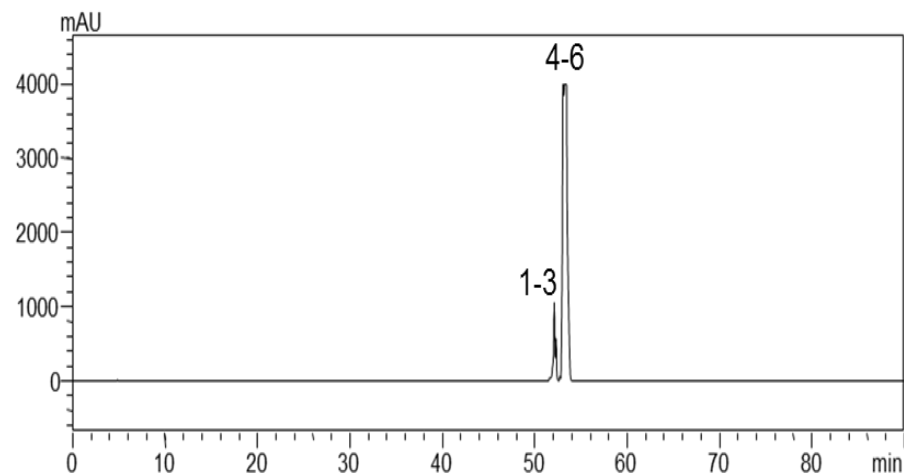
O comportamento da coluna Kinetex, composta por grupos octadecilsilanos – C₁₈ foi avaliado, realizando injeções individuais dos analitos em modo isocrático (Figura 12 A) com composição da fase móvel em 85% de solvente orgânico acetonitrila durante 90 minutos. Além disso, também foi realizada a análise da solução conjunta dos alcaloides na concentração de 100 µg mL⁻¹ em modo gradiente (Figura 12 B), variando a composição da fase móvel (Tabela S1 no Apêndice 1).

Figura 12 Comparação qualitativa dos cromatogramas resultantes da análise dos alcaloides na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ na coluna Kinetex, sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registradas em 320 nm, onde A= eluição em modo isocrático e B= eluição em modo gradiente, sendo 1-triptamina, 2-*N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.

A) Eluição em modo isocrático



B) Eluição em modo gradiente

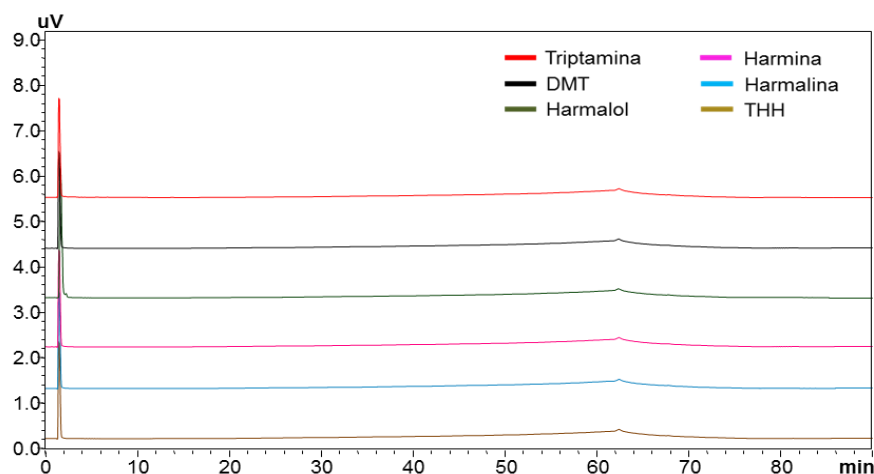


Pode-se inferir que os analitos responderam bem ao detector de arranjo de diodos, porém os alcaloides apresentaram tempos de retenção semelhantes em modo isocrático, 10-12 min, na coluna Kinetex. Em modo gradiente essa coluna também apresentou comportamento semelhante, o que inviabilizou a separação dos picos cromatográficos.

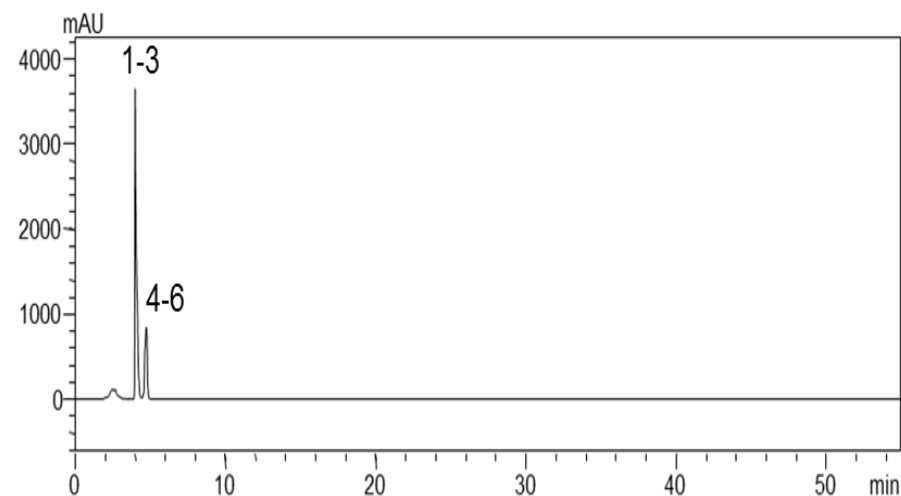
Na observação da coluna Luna Hilic, composta por grupos dióis, foi verificado comportamento semelhante à coluna Kinetex no que diz respeito à co-eluição dos alcaloides, porém com menores tempos de retenção em comparação a coluna Kinetex. O modo isocrático na coluna Luna Hilic pode ser visualizado na Figura 13 A, enquanto que o modo gradiente na Figura 13 B com alteração na composição da fase móvel (Tabela S2 no Apêndice 1).

Figura 13 Comparação qualitativa dos cromatogramas resultantes da injeção dos alcaloides na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ na coluna Luna Hilic, sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registradas em 320 nm, onde A= eluição em modo isocrático e B= eluição em modo gradiente, sendo 1-triptamina, 2-*N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.

A) Eluição em modo isocrático



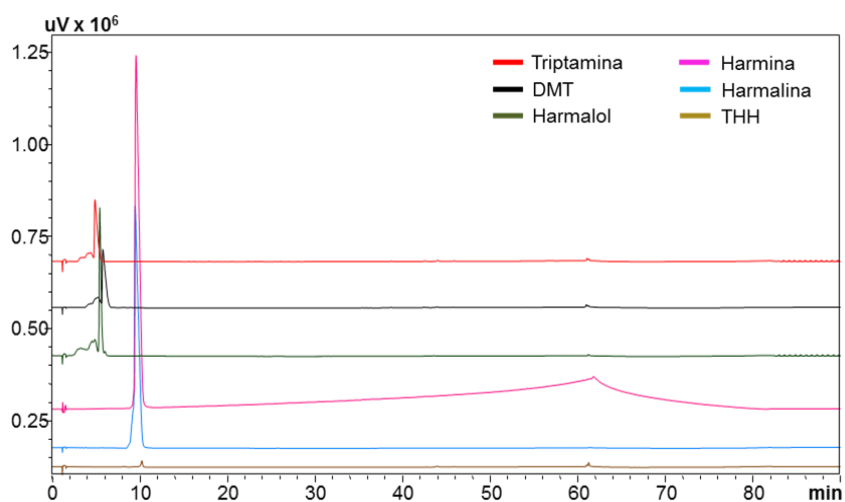
B) Eluição em modo gradiente



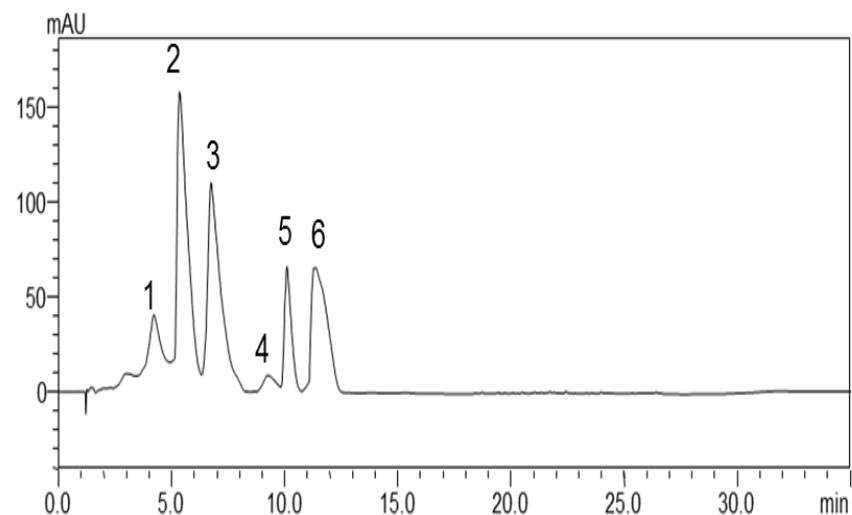
Contudo, a coluna Zorbax Eclipse Plus (composta por grupos octilsilanos - C₈) proporcionou tempos de retenção próximos para os seis alcaloides em modo isocrático (Figura 14 A), porém foi obtida uma melhor separação dos picos cromatográficos em modo gradiente como pode ser observado na Figura 14 B (Tabela S3 no Apêndice 1) em comparação as colunas Kinetex e Luna Hilic.

Figura 14 Comparação qualitativa dos cromatogramas resultantes da análise dos alcaloides na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ na coluna Zorbax registrado em 320 nm, onde A= eluição em modo isocrático e B= eluição em modo gradiente, sendo 1-triptamina, 2-*N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.

A1) Eluição em modo isocrático



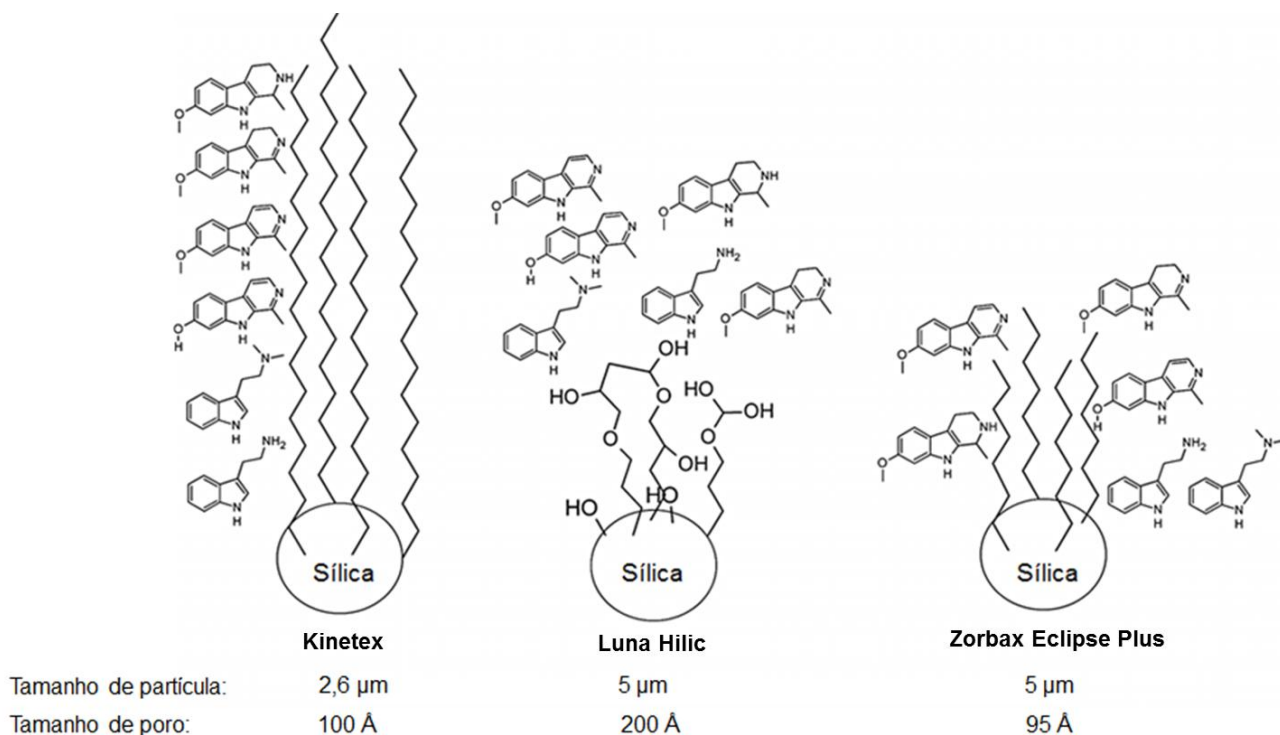
B) Eluição em modo gradiente



Esperava-se a partir do parâmetro diâmetro da partícula que a coluna Kinetex (2,6 μm) apresentasse maior eficiência na separação dos analitos, pois quanto maior o tamanho da partícula, mais lento será o processo de difusão e, conseqüentemente, mais lenta será a transferência de massa dos analitos entre a fase estacionária e a fase móvel [36]. No entanto, notou-se que a coluna Zorbax Eclipse Plus (5 μm) obteve maior eficiência no processo de separação.

Assim, sugere-se que o parâmetro das interações hidrofóbicas devido ao recobrimento da coluna, *carbono load*, teve maior relevância entre as interações dos analitos com a fase estacionária. Uma vez que o material constituinte da coluna Zorbax Eclipse Plus é o octilsilano (C_8), possuindo menor recobrimento de carbono entre as colunas de fase reversa utilizadas, contendo 7%. A coluna Kinetex possui 12%. O menor recobrimento viabilizou uma melhor separação dos alcaloides (Figura 15) [43].

Figura 15 Ilustração da superfície de interação entre as partículas do recheio das colunas cromatográficas Kinetex, Luna Hilic e Zorbax Eclipse Plus, e os alcaloides.



A Figura 15 demonstra a interação com a extensa cadeia carbônica da coluna Kinetex, promovendo co-eluição dos analitos para um tempo de retenção superior. De maneira contrária, a coluna Luna Hilic (que apresenta grupos dióis vicinais e geminais) possui uma superfície altamente polar, recobrimento de carbono 5%. Isto resultou em tempo de contato insuficiente entre analitos e fase estacionária, ou seja, co-eluição num menor tempo de retenção. Finalmente, para a coluna Zorbax Eclipse Plus, que embora seja de fase reversa, possui menor percentual de recobrimento de carbono em comparação com a coluna Kinetex, o que auxilia a interação com analitos mais polares do grupo de alcaloides investigado resultando em uma melhor separação dos picos cromatográficos.

Em virtude dos resultados obtidos na avaliação de diferentes fases estacionárias, a coluna Zorbax Eclipse Plus foi empregada para o desenvolvimento desse trabalho.

4.3.3 Seleção e composição da fase móvel

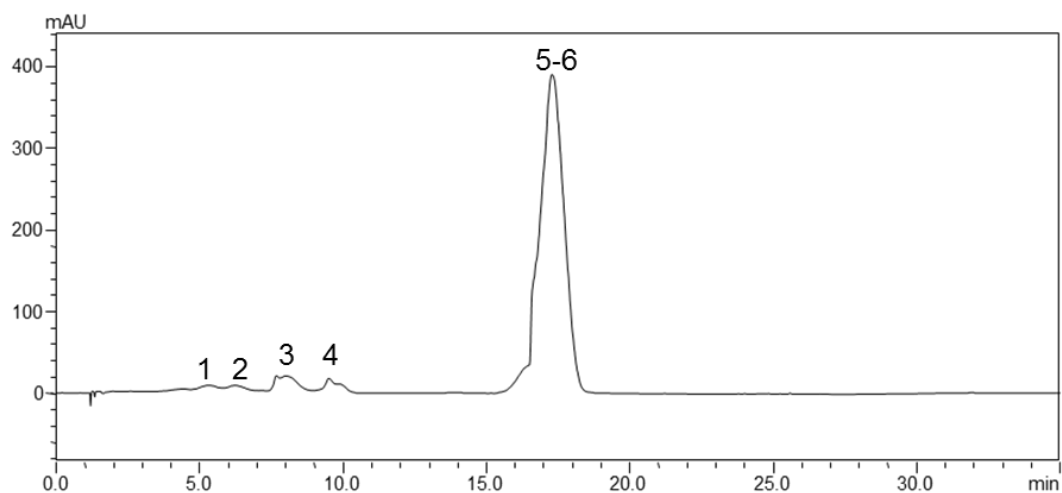
A escolha da fase móvel em cromatografia líquida é importante, pois além de arrastar os componentes da amostra através do sistema cromatográfico também participa do processo de separação [42,44].

Desta forma, dois parâmetros cromatográficos envolvidos na equação geral de resolução, R_s , são fortemente influenciados pela composição da fase móvel: o fator de retenção (k) e o fator de separação (α). Assim, é possível otimizar tanto a força como a seletividade do solvente, parâmetros que determinam a capacidade de dissolver a amostra sem decompor seus componentes [44].

Alguns testes foram realizados para obtenção da composição da fase móvel. Durante os testes iniciais utilizou-se a como solvente orgânico a acetonitrila na composição da fase móvel com o objetivo de conseguir uma melhor separação dos alcaloides. Na Tabela S4 (Apêndice 2) estão apresentadas as primeiras variações na composição da fase móvel avaliadas.

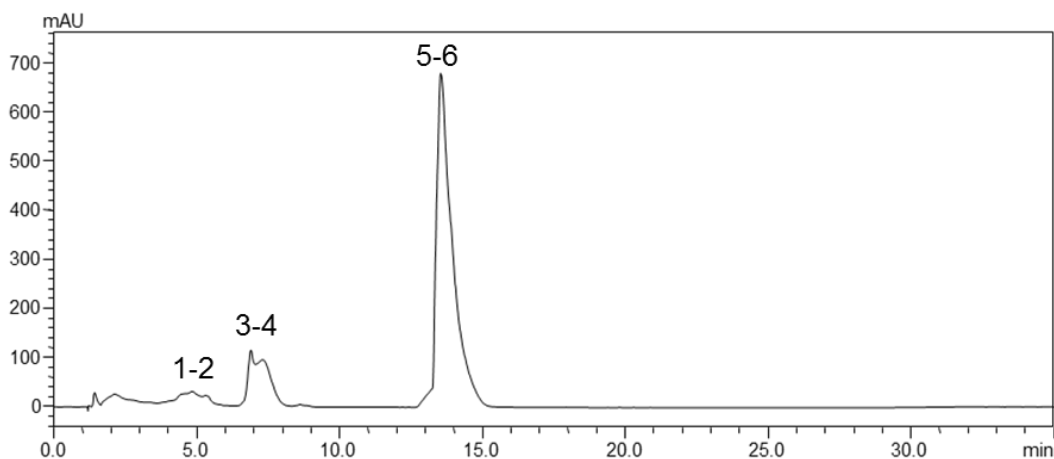
A Figura 16 apresenta o cromatograma resultante dessa análise com as condições cromatográficas descritas na Tabela 3.

Figura 16 Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.



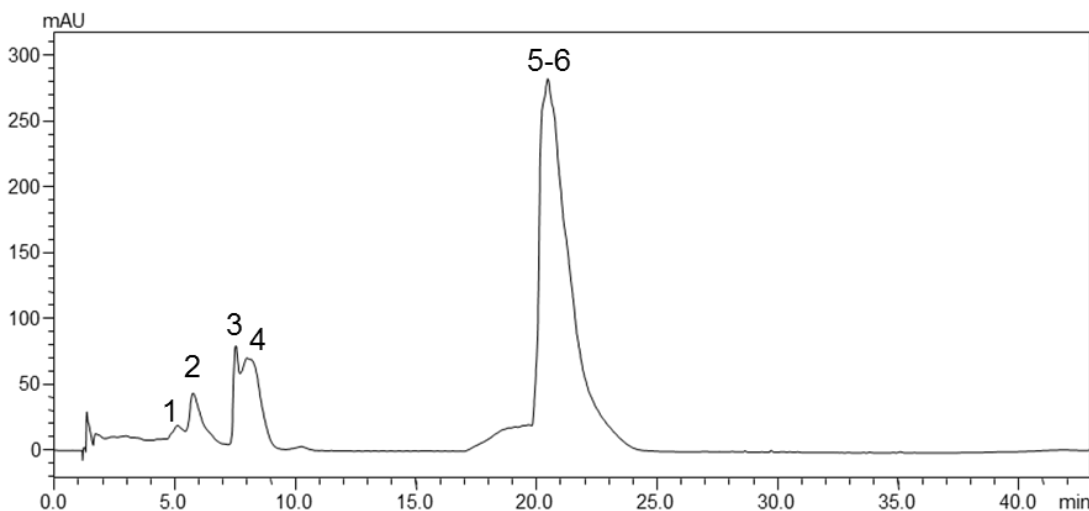
Após a realização desse primeiro experimento não foi possível visualizar uma separação dos alcaloides. Assim, foi realizado um novo teste variando a proporção da fase móvel (Tabela S5 no Apêndice 2) e em seguida está apresentado o cromatograma resultante desse teste (Figura 17).

Figura 17 Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.



Contudo, não foi possível observar um avanço na separação dos analitos. Dessa forma, outra variação na composição (Tabela S6 no Apêndice 2) foi testada para avaliar a separação dos picos cromatográficos referente a esta análise (Figura 18).

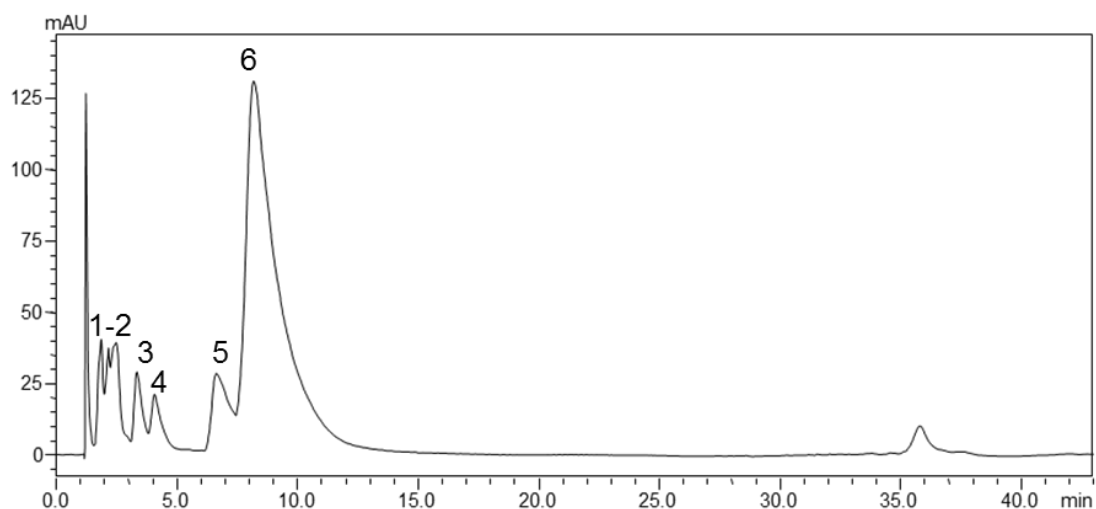
Figura 18 Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.



No entanto, diante das observações na composição da fase móvel com acetonitrila não foi possível obter uma boa separação cromatográfica, com picos simétricos e separados, pois ocorreu co-eluição dos picos cromatográficos. Dessa maneira, optou-se pela substituição do solvente orgânico. Assim, novos testes foram realizados utilizando metanol.

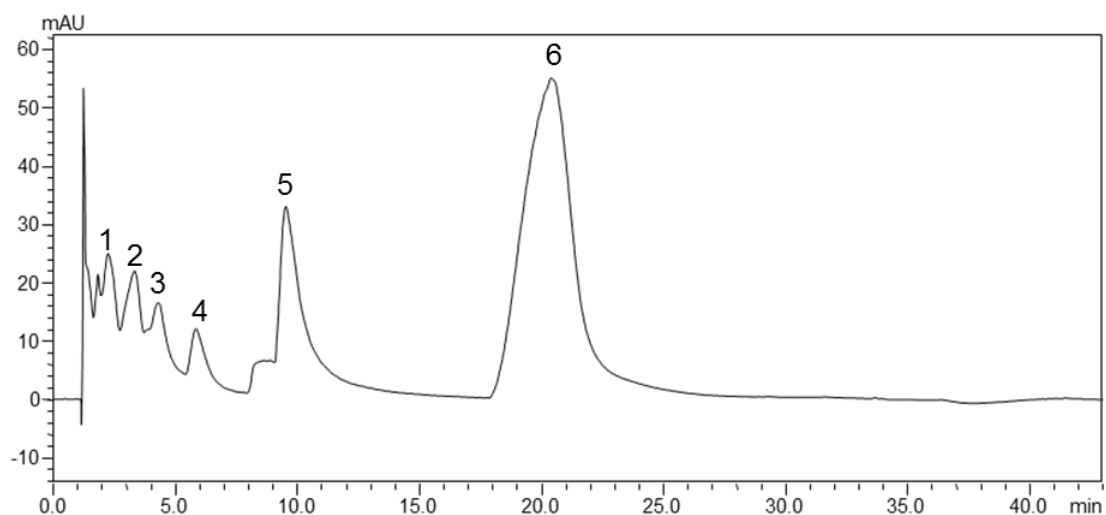
A partir da utilização do metanol na composição da fase móvel houve uma melhora no resultado da separação dos alcaloides (Figura 19), conforme verificado na Tabela S7 no Apêndice 2.

Figura 19 Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.



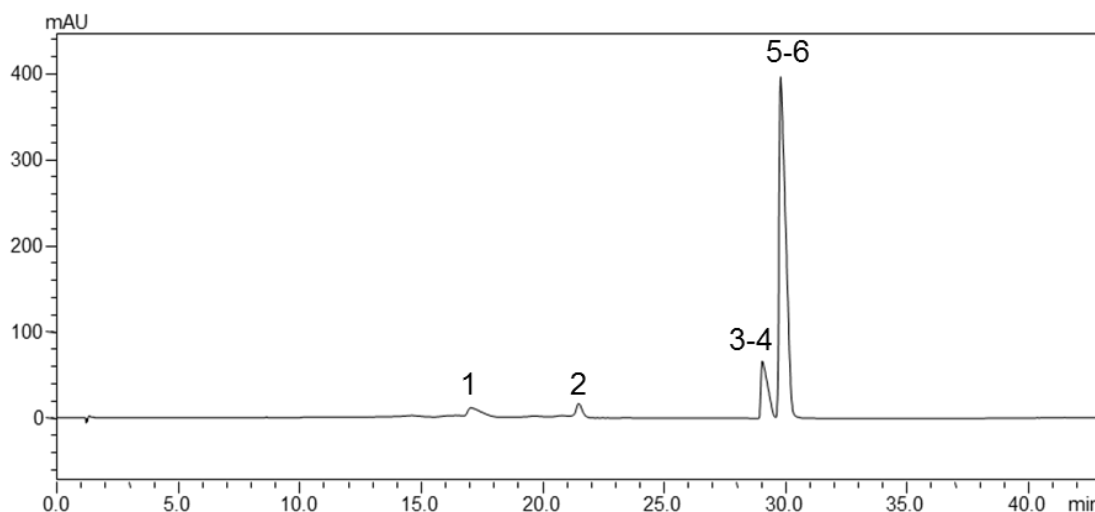
Contudo, ainda foi necessário realizar ajustes na composição da fase móvel para obter uma melhor separação dos analitos. Assim, uma alteração na composição da fase móvel (Tabela S8 no Apêndice 2) foi realizada para aprimorar a separação dos analitos (Figura 20).

Figura 20 Cromatograma referente à análise da solução dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.



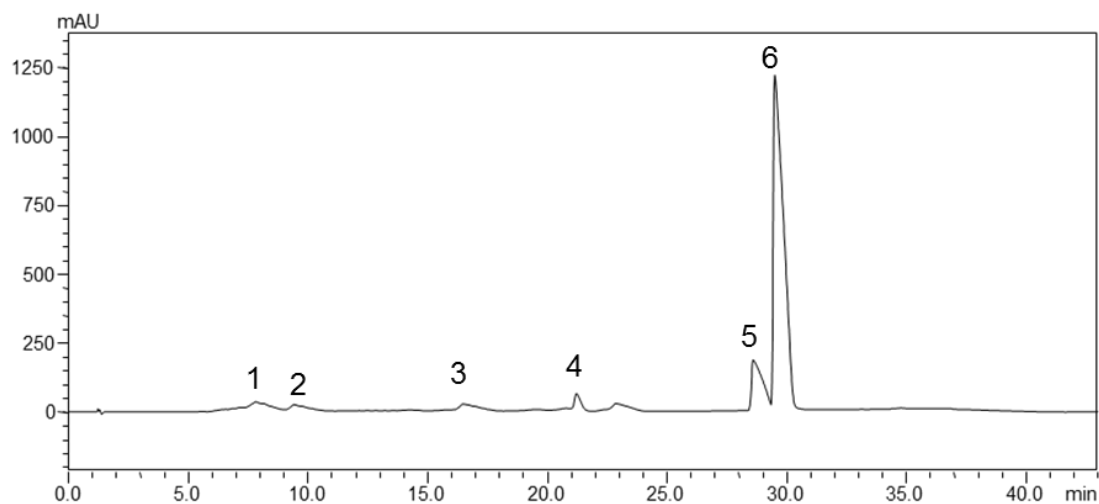
Apesar das alterações realizadas na composição da fase móvel, pouco progresso foi evidenciado utilizando metanol. Logo, considerando o caráter básico dos alcaloides, a fim de alterar a dinâmica de interação entre a fase móvel, a fase estacionária e a amostra, promoveu-se uma acidificação da fase móvel com uma solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (Figura 21). Também foi realizada uma nova alteração na composição da fase móvel (Tabela S9 no Apêndice 2).

Figura 21 Cromatograma referente à análise da solução conjunta dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetilriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.



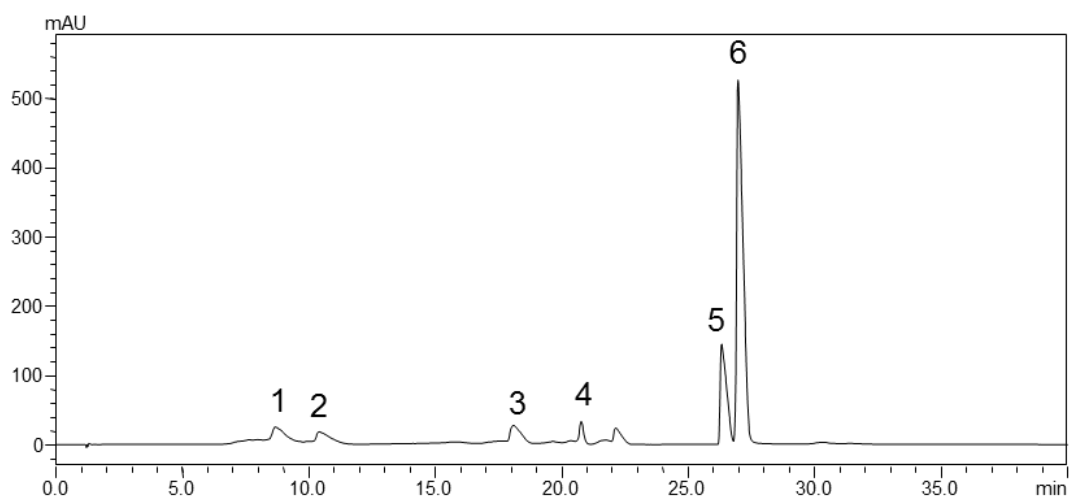
Após a adição de ácido fórmico na composição da fase móvel foi possível observar uma melhoria na separação dos picos cromatográficos referentes aos alcaloides. Ainda foi necessário ajustar a variação da composição da fase (Tabela S10 no Apêndice 2) para haver uma boa separação dos picos bem como uma ótima resposta analítica. Assim, na Figura 22 é observada uma melhora na resolução dos picos para os alcaloides.

Figura 22 Cromatograma referente à análise da solução conjunta dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.



Contudo, um último ajuste na composição da fase móvel (Tabela S11 no Apêndice 2) foi realizado visando uma melhor resolução dos picos, bem como diminuição do tempo da corrida cromatográfica (Figura 23).

Figura 23 Cromatograma referente à análise da solução conjunta dos alcaloides na concentração de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.



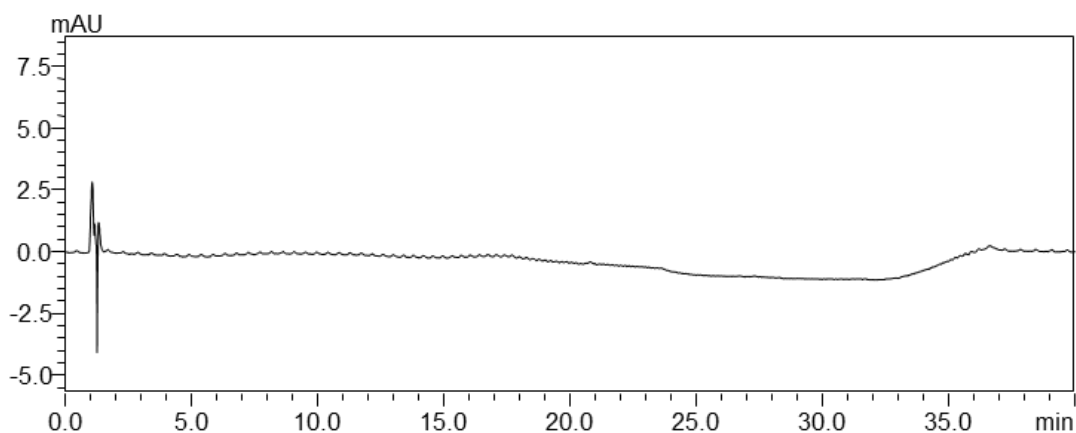
Após a avaliação de diferentes variações na composição da fase móvel, observou-se que a condição da Tabela S11 presente no Apêndice 2 apresentou a melhor resolução (triptamina, tr: 8,67 min; *N,N*-dimetiltriptamina, tr:10,41 min; harmalol, tr: 18,09 min; harmina, tr: 20,77 min, harmalina, tr: 26,33 min e tetrahydroharmina, tr: 27,01 min) e consequentemente essa condição promoveu uma boa separação dos picos cromatográficos (Figura 23).

Dessa forma, para o desenvolvimento deste trabalho ficou estabelecido a composição da fase móvel em metanol/água com adição de solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico, sendo a variação da composição da fase móvel observada na Tabela S11 no Apêndice 2, corroborando a acidificação na fase móvel realizada por González-Ruiz *et al.*, 2011 [45].

4.4 Análise do branco do método cromatográfico

Para verificar a presença de compostos interferentes nos solventes e reagentes que foram empregados na metodologia cromatográfica foi realizada a análise do branco que consiste na aplicação do procedimento experimental sem a inclusão da amostra estudada (Figura 24).

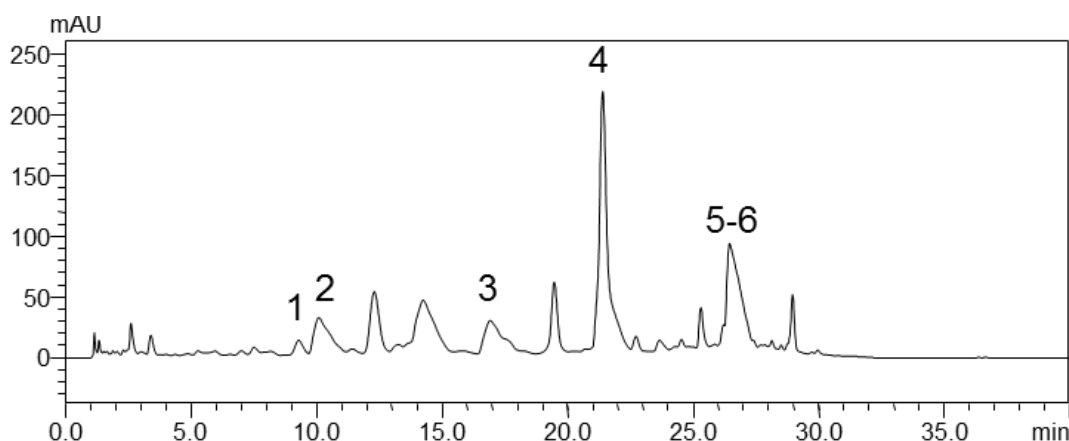
Figura 24 Cromatograma referente à análise do branco do método cromatográfico, sob as condições cromatográficas listadas na Tabela 3.



4.5 Otimização do procedimento de extração em fase sólida

Após a otimização das condições cromatográficas foi realizada uma análise direta da amostra de ayahuasca utilizando as condições previamente estabelecidas no sistema HPLC-DAD: coluna Zorbax, modo gradiente conforme listado na Tabela 4 da fase móvel-metanol/água com adição de solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico, fluxo de injeção $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção $20 \mu\text{L}$ e temperatura da coluna 30°C (Figura 25).

Figura 25 Cromatograma referente à análise da amostra de ayahuasca, utilizando a coluna Zorbax sob condições cromatográficas descritas na Tabela 3 e registradas em 320 nm, onde se sugere: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.



Dessa maneira, foi possível visualizar o registro do sinal dos picos cromatográficos e observar a sensibilidade do equipamento para a amostra de ayahuasca. Contudo, devido à presença de diversos picos interferentes próximos a região de absorção dos alcaloides, podendo haver co-eluição dos picos cromatográficos, mostrou-se pertinente à necessidade de empregar uma técnica de pré-concentração e/ou limpeza da amostra de ayahuasca [46].

Para tal, fez-se uso da técnica de extração em fase sólida (sigla SPE, do inglês, *Solid Phase Extraction*) que é baseada na separação líquido-sólido, tal qual em cromatografia líquida de baixa pressão [47].

As quatro principais etapas envolvidas no procedimento de extração em fase sólida englobam: condicionamento do cartucho, adição da amostra, remoção dos interferentes e eluição do analito. Essa técnica de extração é uma das ferramentas mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas [48].

Para a realização dos experimentos de otimização na extração foram avaliados diferentes sorventes (C_{18} , Florisil®, SAX/PSA, DSC/SAX e Sílica) em cartuchos de SPE (500 mg de sorvente em cada cartucho). Porém, o cartucho de sílica foi preparado no laboratório pesando 500 mg de sílica gel e transferido para um cartucho vazio de SPE. A concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ estabelecida para realização das extrações foi baseada em valores reportados na literatura [24 - 30].

O primeiro experimento desta etapa do trabalho foi realizado com diferentes cartuchos de SPE para observar a capacidade de extração dos alcaloides.

A Tabela 7 mostra os percentuais de recuperação obtidos utilizando no condicionamento 4 mL de metanol e 4 mL de água e em seguida a adição de 20 mL da solução padrão enriquecida com alcaloides na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Logo após, foi realizada a eluição com 3 mL de acetonitrila. Os valores de recuperação das soluções foram calculados a partir de uma solução padrão de comparação de concentração $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 7 Avaliação da eficiência dos sorventes utilizados na extração em fase sólida dos alcaloides (n=1) na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde: TRA= triptamina, DMT= N,N-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina.

Sorvente	TRA (%)	DMT (%)	HRO (%)	HRA (%)	HRL (%)	THH (%)
C_{18}	5,2	9,1	6,1	35,2	5,3	5,5
Florisil	1,6	4,5	2,2	30,3	4,7	20,5
SAX/PSA	2,3	4,9	2,7	4,2	5,9	6,1
DSC/SAX	5,2	4,2	3,8	7,8	8,1	7,5
Sílica	15,3	16,7	13,2	19,4	12,5	15,6

Na presença dos resultados obtidos no primeiro experimento foi observado que o adsorvente sílica gel apresentou melhores percentuais de recuperação, embora com valores divergentes da faixa considerada adequada pela literatura para matrizes complexas (70,0-120,0%) [49].

Dessa maneira, modificações no condicionamento e na eluição utilizando o cartucho de sílica gel foram realizadas, objetivando melhorar o método de extração. As alterações do procedimento de extração foram:

- 1) Ativação do adsorvente sílica gel com 4 mL de metanol e 4 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹;
- 2) Correção do pH da solução contendo os alcaloides para 8 com adição de NaOH 0,01 mol L⁻¹.
- 3) Troca de acetonitrila por metanol como eluente.

A Tabela 8 apresenta os dados de recuperação dos alcaloides após as modificações supracitadas.

Tabela 8 Avaliação da melhor condição de análise para os alcaloides por extração em fase utilizando o cartucho de sílica gel (n=1) na concentração de 100 µg mL⁻¹, onde TRA= triptamina, DMT= N,N-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina.

Metanol	TRA (%)	DMT (%)	HRO (%)	HRA (%)	HRL (%)	THH (%)
Neutro	4,5	1,0	5,0	181,3	29,4	129,3
pH=3	136,0	232,8	159,7	137,0	143,3	127,8
pH=8	67,8	83,6	11,8	4,83	46,4	11,4

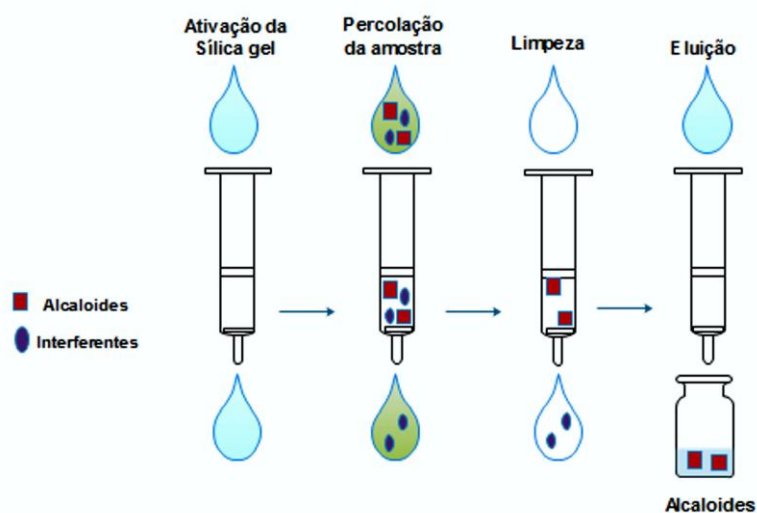
Verifica-se que a acidificação do eluente permitiu maiores valores de recuperação em comparação com o metanol neutro e na forma alcalinizada. Fato que pode ser explicado pela interação dos alcaloides básicos com o solvente acidificado, havendo maior arraste dos analitos na etapa de eluição.

Uma vez que os percentuais de extração no segundo experimento (pH=3) apresentam valores acima do nível estabelecido adequado (70-120%), uma

etapa de limpeza foi adicionada almejando a eliminação de interferentes e possivelmente a diminuição nos percentuais de recuperação. Logo, como solvente de lavagem foi utilizado uma solução de tampão amoniacal (pH=10).

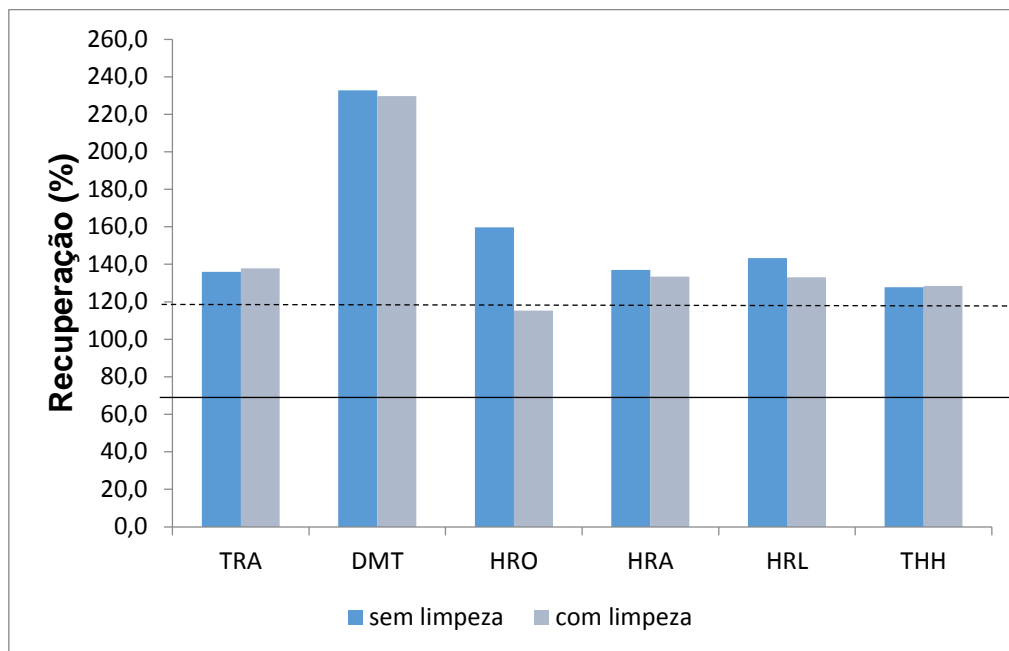
Após a etapa de adição da amostra foi realizada a lavagem do cartucho com 1 mL de solução de tampão amoniacal (pH=10) para remoção do ácido em excesso utilizado na ativação do cartucho e posterior eluição dos analitos com 3 mL de metanol (pH=3), conforme ilustrado na Figura 26.

Figura 26 Principais etapas envolvidas na extração em fase sólida utilizando o cartucho de sílica gel.



A Figura 27 apresenta os valores percentuais de recuperação após a realização dessa extração utilizando a etapa de limpeza com uma solução de tampão amoniacal (pH=10) em comparação com os resultados anteriores sem o processo de limpeza do cartucho.

Figura 27 Avaliação da eficiência da limpeza do cartucho de sílica gel na extração por fase sólida utilizando uma solução de tampão amoniacal (pH=10) com $n=1$ na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde TRA= triptamina, DMT= *N,N*-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina.



De acordo com a Figura 27 ficou evidente que não houve ajuste nos percentuais de recuperação dos alcaloides na faixa de 70 - 120% quando adicionada uma etapa de limpeza no procedimento de extração.

Sugere-se que o fator preponderante para os altos valores de recuperação seja o efeito matriz, isto é, o efeito combinado dos componentes da solução de padrões na medição da quantidade dos analitos [50].

Para solucionar este problema decidiu-se mudar de metanol para água o solvente correspondente à solução dos padrões, mantendo constantes as etapas de condicionamento, adição de amostra e eluição, porém sem etapa de *clean – up*. Ou seja, condicionamento com 4 mL de metanol e 4 mL de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, adição de 20 mL de solução aquosa dos padrões com pH 8 e eluição com 3 mL de metanol pH 3. Os resultados de recuperação dos padrões dos analitos após o processo de SPE encontram-se na Figura 28. É possível observar que a mudança no solvente para o preparo das soluções padrão

resultou em melhores valores nas recuperações, bem como na separação cromatográfica dos picos e limpeza dos interferentes (Figura 29).

Figura 28 Valores de recuperação percentual para os alcaloides na concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ após a etapa de extração utilizando o solvente água para o preparo das soluções padrão ($n=1$), onde TRA= triptamina, DMT= *N,N*-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA= harmina, HRL= harmalina e THH= tetrahydroharmina.

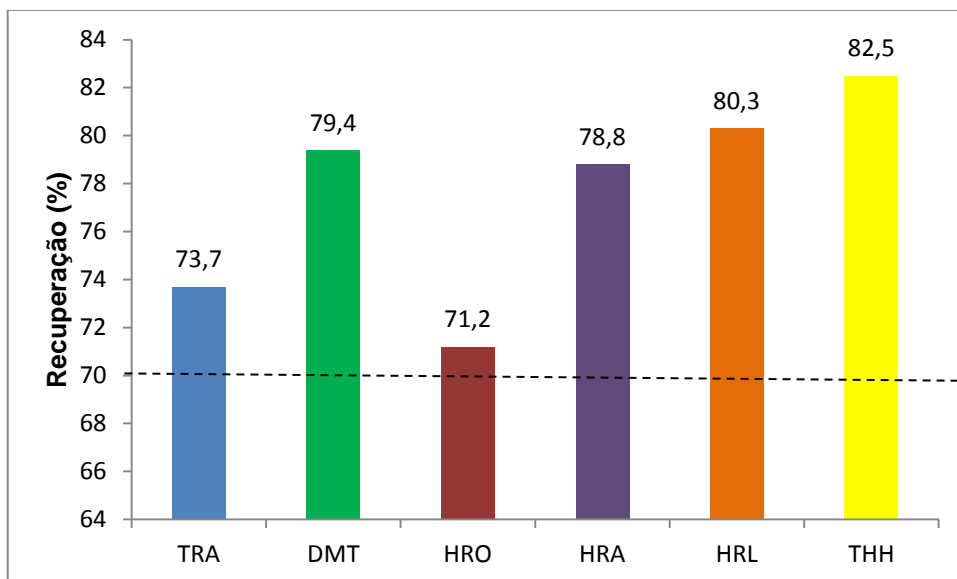
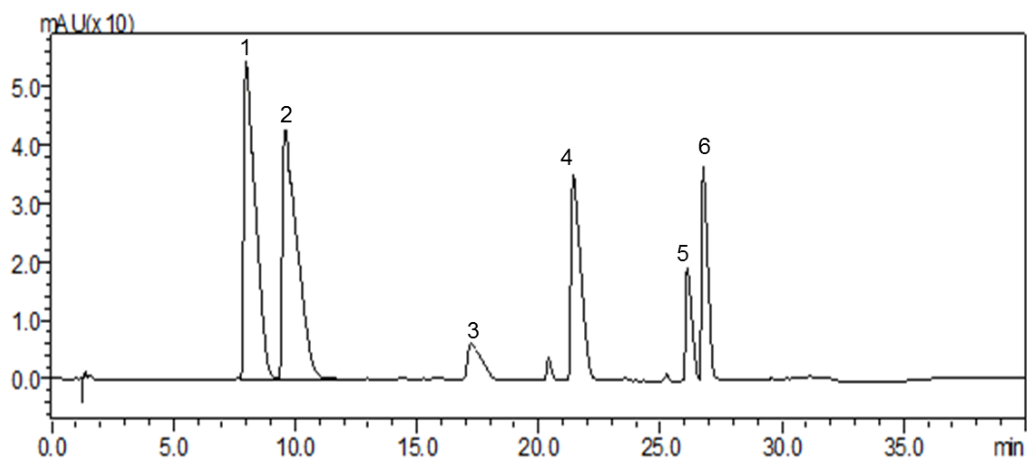


Figura 29 Cromatograma resultante dos alcaloides estudados após o processo de extração utilizando o cartucho de sílica, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahydroharmina.



4.5.1 Fases sólidas alternativas

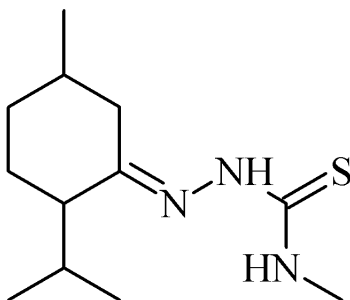
De maneira geral, os materiais utilizados como fases estacionárias em SPE são similares àqueles utilizados em HPLC. Nas últimas décadas, nota-se uma crescente no uso de fases sólidas baseadas em sílica quimicamente modificada. Tem sido reportado que a dopagem com grupos funcionais específicos aumenta a seletividade da fase pelos analitos ou compostos de interesse [42].

Outra vertente está relacionada ao uso de fases estacionárias não baseadas em sílica, pois se afirma a exclusão de fortes interações dos grupos silanóis presentes na superfície da sílica ativada que consequentemente impediriam a eluição de alguns analitos, principalmente de caráter básico [50,51].

Neste contexto, as capacidades adsorptivas de mais duas fases estacionárias com características distintas (baseada e não baseada em sílica) foram avaliadas através da técnica de SPE [52,53].

A fase estacionária baseada em sílica denominada SiMen(M)TSC foi desenvolvida e fornecida pelo Laboratório de Síntese e Aplicação de Materiais – LSAM, da Universidade Federal de Sergipe. Trata-se de um material híbrido *lab-made*, no qual as moléculas de *N*4-metil-Mentona Tiossemicarbazona, Men(M)TSC (Figura 30) foram depositadas na superfície da sílica *via* adsorção e tratamento térmico [54].

Figura 30 Representação bidimensional da estrutura química da *N*4-Metil-Mentona Tiossemicarbazona.



A segunda fase estacionária foi desenvolvida e fornecida pelo Grupo de Petróleo e Energia da Biomassa – PEB da Universidade Federal de Sergipe. Trata-se de um biocarvão (*Biochar*) produzido após pirólise da biomassa da planta aguapé (*Eichornia crassipes*) a 500 °C em ambiente anóxico [55].

Para verificar a eficiência destes adsorventes foram preparados cartuchos contendo 125 e 250 mg de cada material, ou seja, quatro a duas vezes menos massa que os 500 mg utilizados para extração com sílica gel. Quanto à eluição, foram avaliados os volumes de 3 e 6 mL de metanol pH 3. Os resultados de recuperação podem ser visualizados na Tabela 9.

Nota-se a partir do procedimento de extração em fase sólida para os adsorventes que há valores satisfatórios para recuperação e coeficientes de variação quando utilizados 125 mg de biocarvão com volume de eluição 6 mL de metanol pH 3, assim como 250 mg de SiMen(M)TSC e volume de eluição de 3 mL de metanol pH 3. Estes indicam a possibilidade de aplicação dos novos materiais como fases estacionárias para SPE.

Tabela 9 Recuperação média (%) com coeficiente de variação (%) para eficiência (n=3) dos adsorventes alternativos utilizados na extração dos seis alcaloides avaliados na concentração de 100 µg mL⁻¹.

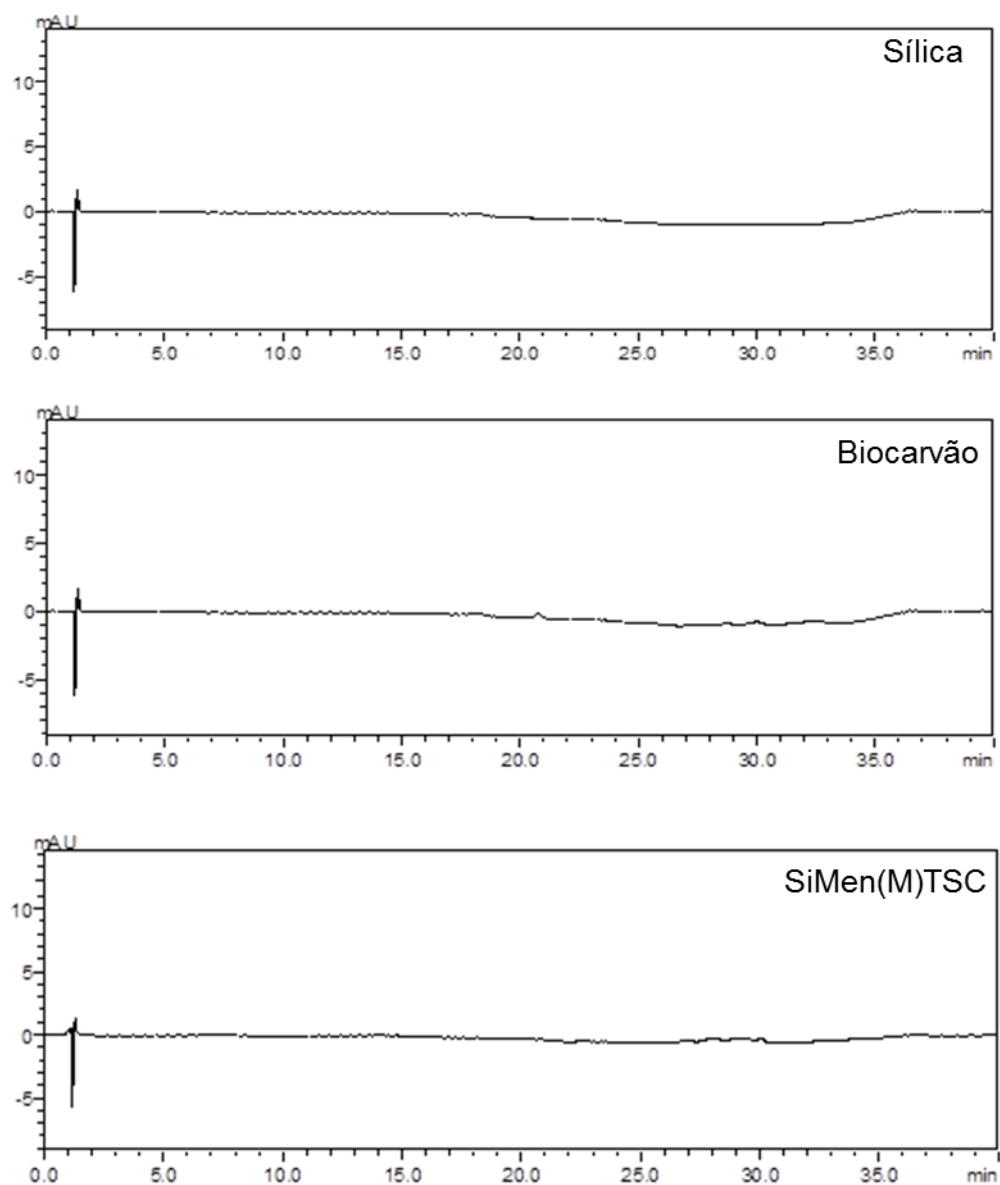
Recuperação média (%) ± CV (%)								
	Biocarvão				SiMen(M)TSC			
	250 mg	250 mg	125 mg	125 mg	250 mg	250 mg	125 mg	125 mg
Massa	250 mg	250 mg	125 mg	125 mg	250 mg	250 mg	125 mg	125 mg
Vol. de Eluição	3 mL	6 mL	3 mL	6 mL	3 mL	6 mL	3 mL	6 mL
Triptamina	56,7 ± 1,6	40,1 ± 2,5	56,9 ± 1,2	73,7 ± 2,6	79,9 ± 2,4	62,3 ± 0,7	50,7 ± 0,9	52,3 ± 2,2
<i>N,N</i> -dimetiltriptamina	62,2 ± 0,8	55,6 ± 1,4	62,1 ± 2,4	74,4 ± 1,3	93,3 ± 2,3	88,4 ± 3,6	71,4 ± 4,2	72,2 ± 1,5
Harmalol	48,2 ± 2,9	20,9 ± 3,3	56,2 ± 1,8	70,1 ± 2,7	69,7 ± 3,2	54,1 ± 1,5	33,3 ± 2,5	40,7 ± 1,1
Harmina	54,3 ± 2,2	43,5 ± 1,7	63,7 ± 2,7	91,9 ± 1,2	78,9 ± 4,4	75,8 ± 2,9	46,3 ± 1,8	53,9 ± 2,6
Harmalina	51,6 ± 3,5	50,9 ± 2,9	60,5 ± 3,5	78,9 ± 2,9	83,6 ± 3,7	79,4 ± 2,4	56,2 ± 2,6	60,8 ± 2,4
Tetrahidroharmina	59,5 ± 1,2	62,2 ± 2,6	51,2 ± 0,8	76,6 ± 1,4	97,5 ± 1,9	93,3 ± 1,3	60,8 ± 1,1	63,1 ± 0,9

A Tabela 9 apresentou os valores de recuperação média para cada fase sólida alternativa utilizada nesse trabalho, variando a massa do adsorvente, bem como o volume de eluição. É possível notar que para o adsorvente biocarvão os melhores valores de recuperação para os alcaloides foram utilizando uma massa de adsorvente igual a 125 mg com 6 mL de volume para eluição dos mesmos. Para o adsorvente SiMen(M)TSC foi observado os melhores de recuperação para os alcaloides com uma massa de adsorvente igual a 250 mg e 3 mL de volume para eluição dos mesmos. Assim, nota-se que empregando tanto o biocarvão como o SiMen(M)TSC como fase alternativa é possível utilizar uma massa menor de adsorvente quando comparada a massa de adsorvente comercial.

4.6 Análise do branco do método de extração

Para garantir resultados coerentes é importante observar a presença de compostos interferentes em solventes e reagentes utilizados no desenvolvimento da metodologia. Assim, foi realizada a análise do branco para o método de extração proposto para os três adsorventes, que consiste na aplicação do procedimento experimental sem a inclusão da amostra estudada (Figura 31).

Figura 31 Cromatograma referente a análise do branco do método de extração proposto para os adsorventes sílica, biocarvão e SiMen(M)TSC, respectivamente.



Foi possível inferir a partir da análise do branco do método de extração para cada adsorvente que não houve a presença de interferentes nos picos cromatográficos referentes aos alcaloides em estudo.

4.7 Validação do método analítico

A validação do método analítico envolve um procedimento que comprova que o método oferece os resultados esperados com confiabilidade, precisão e exatidão adequados [42].

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação, robustez, entre outros [56].

4.7.1 Linearidade e Sensibilidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma faixa analítica especificada, sendo possível relacionar a resposta do detector à concentração [56]. Após o processamento dos dados obtidos neste trabalho, a linearidade foi avaliada pela regressão linear da curva analítica obtida através da equação $y = ax + b$. Logo, a linearidade é considerada satisfatória quando o coeficiente de correlação da reta não é diferente estaticamente da unidade, sendo aceitável para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) um mínimo de 0,99 [57].

Na Tabela 10 temos as equações da reta para os seis alcaloides nos três adsorventes utilizados para o desenvolvimento do método, bem como os respectivos coeficientes de correlação, onde para o adsorvente sílica os valores de coeficiente de correlação variaram na faixa de 0,9950 - 0,9994, para o adsorvente biocarvão variaram na faixa de 0,9985 - 0,9998 e para o adsorvente SiMen(M)TSC teve uma faixa de variação de 0,9969 - 0,9996. Assim, os elevados valores de coeficiente de correlação indicam uma relação linear entre a concentração dos alcaloides e as respostas cromatográficas para o intervalo proposto de trabalho ($1 - 300 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Tabela 10 Regressão linear (n=3) da curva analítica e o coeficiente de correlação (R) para os três diferentes adsorventes analisados com os seis alcaloides avaliados no intervalo de concentração de 1 - 300 µg mL⁻¹.

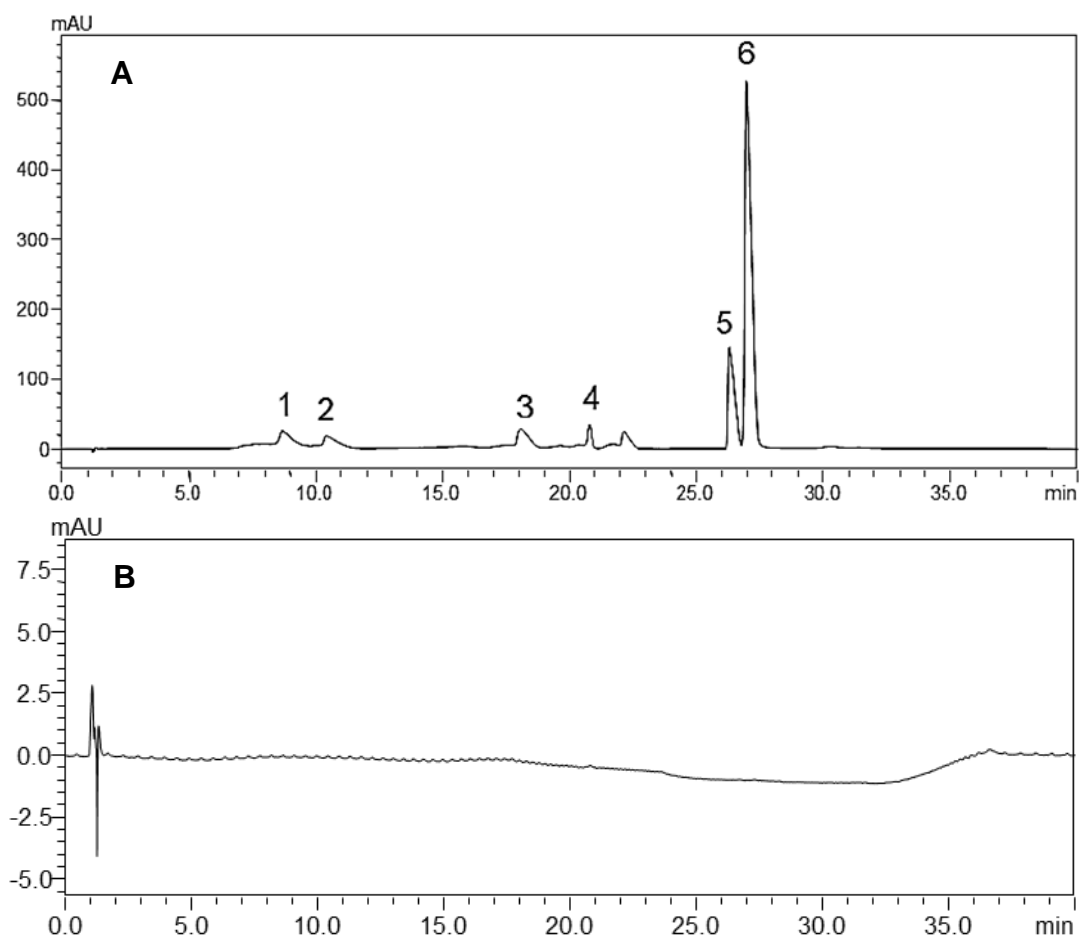
Equação da Reta e Coeficiente de Correlação (R)						
Alcaloide	Sílica		Biocarvão		SiMen(M)TSC	
Triptamina	$y = 15839x + 96013$	0,9943	$y = 18116x - 13119$	0,9996	$y = 19024x - 44022$	0,9995
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	$y = 9753,3x - 169,9$	0,9919	$y = 17943x - 26973$	0,9987	$y = 19226x - 30233$	0,9996
Harmalol	$y = 19228x + 71563$	0,9929	$y = 39634x - 262712$	0,9985	$y = 39480x - 195100$	0,9969
Harmina	$y = 7303,2x + 58996$	0,9905	$y = 10583x + 32650$	0,9993	$y = 9542,6x - 18206$	0,9992
Harmalina	$y = 42766x + 298629$	0,9904	$y = 65436x - 147207$	0,9998	$y = 65419x + 213058$	0,9979
Tetrahydroharmina	$y = 41180x + 462149$	0,9902	$y = 63204x - 187277$	0,9995	$y = 66258x + 128083$	0,9988

Após a obtenção das equações da reta foi avaliado a sensibilidade do método, que está correlacionada com o coeficiente angular da reta. Assim, quanto maior a inclinação maior a sensibilidade [58]. Dessa forma, observou-se que tanto para o adsorvente sílica quanto para o adsorvente biocarvão o alcaloide harmalina apresentou a maior sensibilidade de resposta com a variação da concentração, enquanto que o alcaloide harmina apresentou a menor sensibilidade. Para o adsorvente SiMen(M)TSC a maior sensibilidade de resposta com a variação da concentração foi observada para o alcaloide tetrahydroharmina, contudo o alcaloide harmina apresentou menor sensibilidade.

4.7.2 Seletividade

A seletividade avalia a capacidade do método analítico em determinar um analito ou uma classe de espécies químicas de maneira inequívoca na presença de outras substâncias suscetíveis a interferirem na análise [58]. Dessa maneira, a método proposto mostrou-se ser seletivo aos alcaloides triptamina (tr: 8,67 min), *N,N*-dimetiltriptamina (tr: 10,41 min) , harmalol (tr: 18,09 min), harmina (tr: 20,77 min), harmalina (tr: 26,33 min) e tetrahydroharmina (tr: 27,01 min). A seletividade foi avaliada comparando os cromatogramas da solução fortificada (A) com a solução livre dos alcaloides (B) após passagem pelo sistema de extração SPE, como pode ser observado na Figura 32.

Figura 32 Comparação da solução fortificada (A) com a solução livre dos alcaloides, sob condições cromatográficas listadas na Tabela 3, e registrado em 320 nm, onde: 1- triptamina, 2- *N,N*-dimetiltriptamina, 3-harmalol, 4-harmina, 5-harmalina e 6-tetrahidroharmina.



4.7.3 Exatidão

A exatidão do método analítico é conceituada como sendo o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado experimento e um valor de referência considerado como verdadeiro [59]. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação e adição padrão [56].

Para esse estudo a exatidão foi avaliada a partir de ensaios de recuperação. A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada [56].

Na Tabela 11 apresentam-se os valores médios de recuperação e os coeficientes de variação para a extração por SPE dos alcaloides triptamina, N,N-dimetiltriptamina, harmalol, harmina, harmalina e tetrahydroharmina utilizando os adsorventes sílica, biocarvão e SiMen(M)TSC. Os níveis de fortificação avaliados no presente estudo foram: 1; 5; 10; 50; 100; 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os quais estão reportados em alguns trabalhos na literatura com variação entre 0,5 - 126 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [1, 34, 35].

Tabela 11 Recuperação média (n=3) com coeficiente de variação dos seis alcaloides avaliados com os três adsorventes avaliados em cinco níveis de fortificação.

Alcaloide	Nível de fortificação ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação Média (%) \pm CV (%)		
		Sílica	Biocarvão	SiMen(M)TSC
Triptamina	1	76,6 \pm 9,6	86,1 \pm 3,6	74,7 \pm 2,3
	5	92,7 \pm 6,1	79,7 \pm 2,8	76,1 \pm 2,6
	10	106,9 \pm 6,1	70,2 \pm 1,5	78,3 \pm 1,5
	50	86,9 \pm 5,8	90,5 \pm 3,5	72,4 \pm 3,5
	100	82,7 \pm 7,9	71,4 \pm 4,9	76,7 \pm 5,1
	250	94,3 \pm 6,4	89,2 \pm 1,5	76,2 \pm 3,6
<i>N,N</i> -dimetilriptamina	1	69,5 \pm 6,1	97,5 \pm 5,3	63,9 \pm 9,6
	5	82,9 \pm 7,2	79,5 \pm 4,7	78,6 \pm 3,9
	10	103,6 \pm 6,2	79,9 \pm 2,4	80,8 \pm 0,5
	50	82,7 \pm 1,8	92,7 \pm 4,3	82,4 \pm 4,8
	100	84,1 \pm 6,9	71,7 \pm 1,1	84,9 \pm 0,8
	250	93,3 \pm 2,5	112,6 \pm 1,8	82,9 \pm 2,4
Harmalol	1	45,0 \pm 5,5	40,6 \pm 3,4	45,3 \pm 8,8
	5	59,4 \pm 2,3	43,4 \pm 1,1	58,2 \pm 1,9
	10	71,7 \pm 2,1	69,3 \pm 1,0	72,5 \pm 2,8
	50	79,9 \pm 1,9	74,8 \pm 10,7	86,5 \pm 0,4
	100	81,0 \pm 3,1	94,9 \pm 3,9	79,9 \pm 8,7
	250	95,7 \pm 9,8	116,2 \pm 4,3	88,2 \pm 1,3
Harmina	1	84,5 \pm 2,7	108,9 \pm 1,5	77,1 \pm 3,4
	5	86,0 \pm 2,8	85,4 \pm 6,3	79,3 \pm 2,5
	10	101,3 \pm 2,4	89,2 \pm 9,5	77,0 \pm 0,8
	50	88,2 \pm 3,0	105,4 \pm 3,6	78,9 \pm 1,1
	100	91,6 \pm 4,2	85,1 \pm 1,7	80,9 \pm 0,9
	250	103,7 \pm 3,2	101,4 \pm 0,9	77,9 \pm 2,1
Harmalina	1	77,9 \pm 7,7	76,5 \pm 1,6	115,7 \pm 2,1
	5	82,5 \pm 6,8	74,5 \pm 1,3	88,2 \pm 2,4
	10	95,0 \pm 5,5	72,2 \pm 3,3	78,9 \pm 1,2
	50	83,0 \pm 5,1	88,1 \pm 2,0	90,6 \pm 0,5
	100	89,7 \pm 6,1	75,1 \pm 2,1	80,5 \pm 2,2
	250	98,7 \pm 2,6	94,8 \pm 0,8	85,2 \pm 3,3
Tetrahydroharmina	1	73,5 \pm 3,1	76,1 \pm 1,4	103,6 \pm 6,0
	5	79,9 \pm 5,8	74,1 \pm 0,7	79,6 \pm 3,3
	10	96,8 \pm 1,1	84,8 \pm 2,4	79,6 \pm 3,1
	50	87,7 \pm 2,9	85,8 \pm 3,7	77,2 \pm 7,1
	100	94,6 \pm 1,8	75,5 \pm 0,4	86,3 \pm 1,5
	250	107,4 \pm 2,9	92,7 \pm 1,4	83,2 \pm 1,2

Foi observado na Tabela 11 resultados satisfatórios de recuperação para todos os alcaloides em diferentes níveis de concentração, exceto para o harmalol em baixos níveis de concentração. Dessa forma, o alcaloide apresenta baixa exatidão nos níveis de fortificação de 1 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obtendo uma recuperação de 25,0% e 59,4% com coeficiente de variação 58,5% e 26,3%, respectivamente.

4.7.4 Precisão

A relação entre o valor encontrado pelo método e o valor aceito como verdadeiro ou de referência é denominada exatidão e pode ser expressa em função dos coeficientes de variação (CV) ou desvios padrão relativos (RSD) segundo a equação [57 - 59]:

$$CV (\%) \text{ ou } RSD (\%) = \frac{s}{x} \times 100$$

Onde s corresponde ao desvio padrão e x é a média aritmética das determinações. Para métodos de análise de matrizes complexas são aceitos coeficientes de variação de até 20% [57, 59].

Para esse estudo foi verificada a precisão intradia de solução padrão na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, bem como a precisão interdias, conforme pode ser observado na Tabela 12. É possível notar que os coeficientes de variação obtidos a partir da resposta da área cromatográfica para alcaloides triptamina, N,N-dimetiltriptamina, harmalol, harmina, harmalina e tetrahydroharmina indicam que o método proposto apresenta boa precisão, tendo em vista que os resultados encontram-se inferiores a 20% conforme sugere Ribani *et al.*, 2004 [56].

Tabela 12 Precisão para o método desenvolvido (n=5) utilizando os três adsorventes analisados com os seis alcaloides avaliados na concentração de 100 µg mL⁻¹.

Alcaloide		Área Média ± CV (%)		
		Sílica	Biocarvão	SiMen(M)TSC
Triptamina	1º DIA	2060590,1 ± 0,4	1753919,4 ± 0,6	1616327,8 ± 0,4
	2º DIA	2064767,0 ± 0,5	1750376,6 ± 0,3	1618508,9 ± 0,3
	3º DIA	2055879,4 ± 0,2	1750227,8 ± 0,4	1615268,8 ± 0,4
	Interdias	2060412,2 ± 0,2	1751507,9 ± 0,1	1616701,8 ± 0,1
N,N-dimetiltriptamina	1º DIA	2014385,2 ± 0,8	1708287,6 ± 0,6	1744227,4 ± 0,6
	2º DIA	2014337,4 ± 0,5	1666647,2 ± 0,2	1735675,8 ± 0,7
	3º DIA	2008308,0 ± 0,8	1646028,5 ± 1,9	1741739,8 ± 0,4
	Interdias	2012343,5 ± 0,2	1673654,4 ± 1,8	1740547,7 ± 0,2
Harmalol	1º DIA	3135915,3 ± 0,3	3679017,9 ± 0,2	3094247,1 ± 0,2
	2º DIA	3143633,4 ± 0,3	3676403,2 ± 0,3	3082941,4 ± 0,1
	3º DIA	3153704,7 ± 0,2	3678654,1 ± 0,4	3098421,1 ± 0,1
	Interdias	3144417,8 ± 0,3	3678025,1 ± 0,1	3091869,9 ± 0,3
Harmina	1º DIA	1175848,5 ± 0,4	1044817,4 ± 0,7	873777,9 ± 0,3
	2º DIA	1177018,1 ± 0,6	1035417,9 ± 0,4	882751,9 ± 0,4
	3º DIA	1178288,2 ± 0,3	1045585,5 ± 1,2	881154,2 ± 0,2
	Interdias	1177051,6 ± 0,1	1041940,3 ± 0,5	879228,0 ± 0,5
Harmalina	1º DIA	7075207,9 ± 0,3	6437846,4 ± 0,5	6312723,4 ± 0,3
	2º DIA	7100576,9 ± 0,4	6429788,2 ± 0,2	6259022,6 ± 1,4
	3º DIA	7100051,9 ± 0,3	6438120,4 ± 0,2	6325930,4 ± 0,2
	Interdias	7091945,6 ± 0,2	6435251,7 ± 0,1	6299225,5 ± 0,6
Tetrahidroharmina	1º DIA	7497972,5 ± 0,4	5907134,2 ± 0,4	6326436,4 ± 0,2
	2º DIA	7509109,4 ± 0,5	5911967,5 ± 0,3	6337444,4 ± 0,1
	3º DIA	7511947,5 ± 0,2	5924425,8 ± 0,2	6350322,1 ± 0,2
	Interdias	7506343,1 ± 0,1	5914509,2 ± 0,1	6338067,6 ± 0,2

4.7.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O Limite de Detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental [56-58]. O Limite de Quantificação (LQ) corresponde a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com fidelidade determinada [59]. Desta maneira, diferentes procedimentos podem ser aplicados para a determinação do LD e LQ como sugere Ribanni *et al.*, 2004 [56]: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica.

Assim, para o desenvolvimento desse trabalho os LD e LQ foram baseados em parâmetros da curva analítica, utilizando as seguintes relações matemáticas:

$$LD = 3 \times \frac{s}{S} \quad e \quad LQ = 10 \times \frac{s}{S}$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta e S é o coeficiente angular da curva analítica [56].

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos dos LD e LQ do método proposto para determinação dos alcaloides em amostras de ayahuasca.

Tabela 13 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os três diferentes adsorventes analisados com os seis alcaloides avaliados.

Alcaloide	Sílica		Biocarvão		SiMen(M)TSC	
	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Triptamina	7,5	22,7	4,7	14,4	5,7	17,2
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	18,8	57,1	9,5	28,7	5,3	16,2
Harmalol	13,8	41,8	9,9	30,2	14,4	43,7
Harmina	11,6	35,3	6,6	20,1	7,2	21,7
Harmalina	6,8	20,6	3,5	10,5	11,8	35,8
Tetrahydroharmina	17,5	53,1	5,4	16,4	8,8	26,6

Observa-se que os limites de detecção e quantificação encontrados para os alcaloides variaram de 6,8 - 18,8 e 20,6 - 57,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para o adsorvente comercial sílica; de 3,5 - 9,9 e 10,5 - 30,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para o adsorvente alternativo biocarvão e de 5,3 - 14,4 e 16,2 - 43,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, os quais podem ser considerados satisfatórios de acordo com o que é reportado na literatura, na faixa entre 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente [4].

Após a validação do método foram obtidas boas figuras de méritos, onde se observou bons resultados de precisão e exatidão para os alcaloides estudados, bem como linearidade, sensibilidade e seletividade. Além disso, o método proposto também apresentou limites de detecção e quantificação satisfatórios, a partir da curva analítica de cada alcaloide, apresentado valores coerente com os aferidos na bebida ayahuasca.

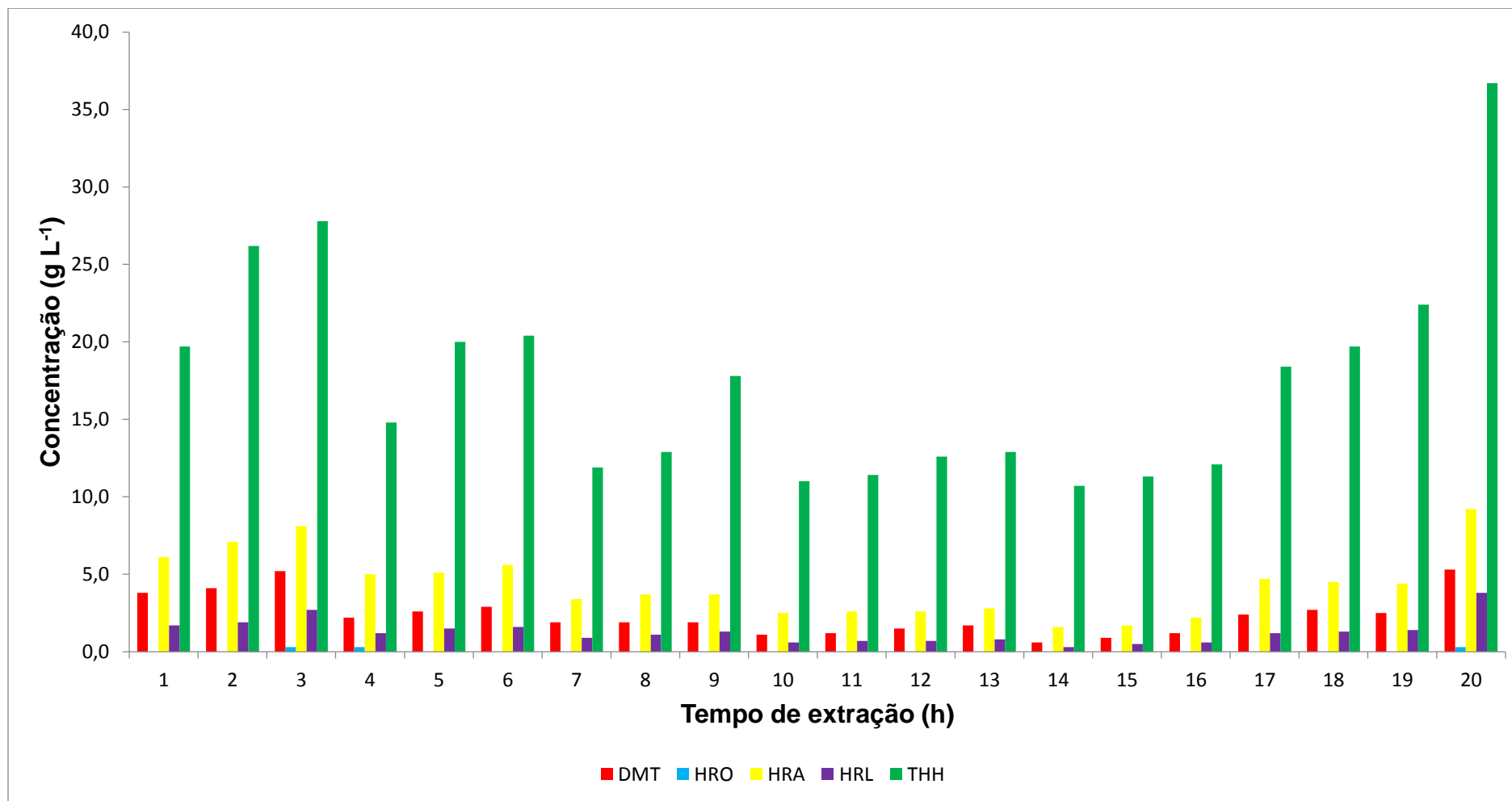
4.8 Aplicação do método em amostras da bebida ayahuasca

Os métodos estudados neste trabalho foram aplicados em amostras da bebida ayahuasca coletadas em centro religioso na cidade de Fortaleza/CE.

No primeiro momento foi realizado o procedimento de SPE utilizando o cartucho comercial de sílica seguindo metodologia citada anteriormente, para as 20 frações.

A partir dos resultados obtidos após o desenvolvimento da extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD foi possível observar um perfil de decréscimo na concentração dos alcaloides com o passar do tempo de extração (Figura 33).

Figura 33 Valores de concentração em g L^{-1} encontrados para os alcaloides utilizando o adsorvente sílica na bebida ayahuasca, onde: DMT=*N,N*-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA=harmina, HRL=harmalina e THH=tetrahydroharmina.

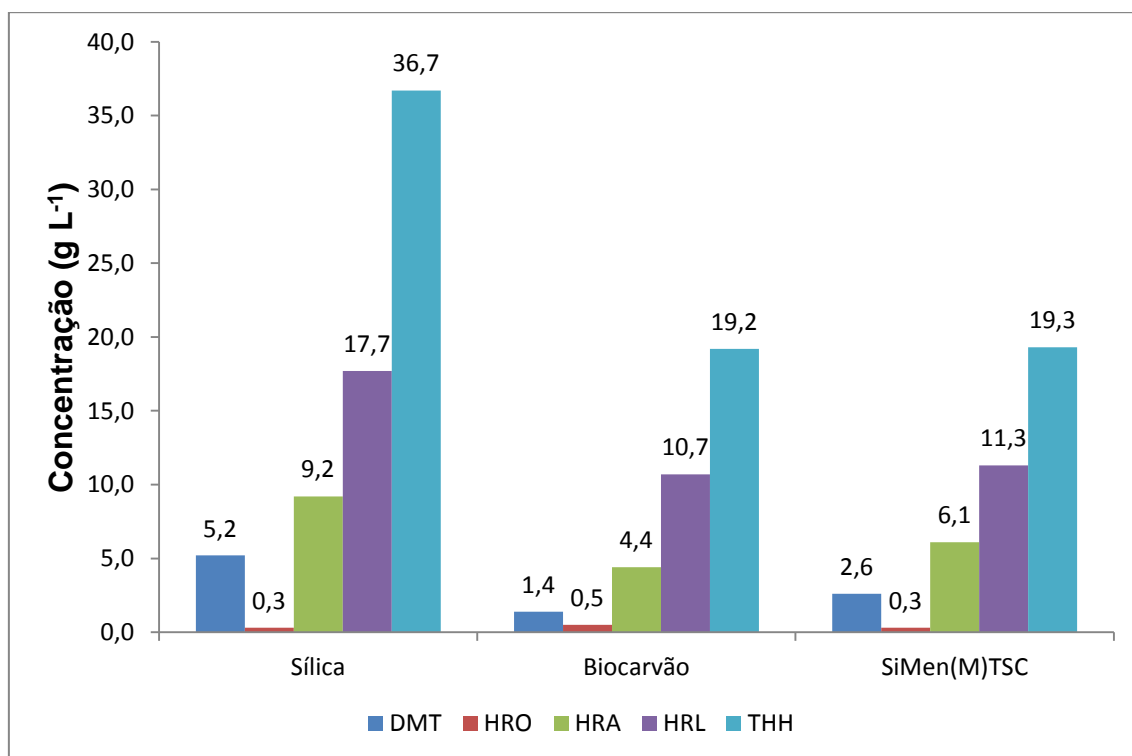


O perfil observado na Figura 33 pode ser explicado pelo fato de que após cada extração a resultante em quantidade em matéria para cada alcaloide será menor.

O aumento observado para as frações de 17 a 20 pode ser explicado pela junção de todas as frações anteriores para formação do apuro, observando que para esse centro religioso a bebida ayahuasca (apuro) contém significativas concentrações do DMT e das β -carbolinas. Sugere-se que a ausência do alcaloide triptamina está relacionada com a completa bioconversão em DMT na planta [12, 13].

Assim, para as fases alternativas foi realizado o mesmo procedimento sendo avaliado apenas as frações do apuro. Dessa maneira, foi possível obter os valores de concentração para os alcaloides em cada adsorvente tanto comercial quanto alternativo (Figura 34).

Figura 34 Valores de concentração em g L^{-1} encontrados para os alcaloides, utilizando as três fases sólidas, na bebida ayahuasca, onde: DMT=*N,N*-dimetiltriptamina, HRO= harmalol, HRA=harmina, HRL=harmalina e THH=tetrahydroharmina.



Na figura 34 temos os valores de concentração para os alcaloides obtidos após os trabalhos experimentais com as amostras da bebida ayahuasca. Foi possível observar concentrações dos alcaloides na faixa de 0,3 - 36,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ utilizando o adsorvente sílica, 0,5 - 19,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o adsorvente biocarvão e 0,3 - 19,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o adsorvente SiMen(M)TSC, conforme as condições experimentais de análise. Os valores encontrados apresentam menores concentrações que dados reportados na literatura, na faixa entre 0,2 - 1,7 mg mL^{-1} . Assim, diante dos valores encontrados neste trabalho é importante ressaltar o provável poder alucinógeno desta bebida [10, 25].

5 CONCLUSÃO

Foi apresentado neste trabalho o desenvolvimento de um método analítico por sistema HPLC-DAD adequado à determinação dos alcaloides indólicos triptamina, *N*, *N*-dimetilriptamina, harmalina, harmalol, harmina e tetrahydroharmina em amostra de ayahuasca, uma bebida de cunho religioso com propriedade psicoativa, amplamente consumida em diversos países.

Como não foi possível avaliar a presença dos analitos por análise direta da amostra de ayahuasca, devido à presença de interferentes, foi empregada a técnica de extração em fase sólida. Após otimizações nos procedimentos de extração, observou-se que a utilização da sílica gel como fase estacionária apresentou os melhores valores de recuperação 69,5 - 107,4%, exceto para o harmalol em baixos níveis de concentração. O método proposto apresentou boa exatidão e precisão, bem como os limites de detecção e quantificação encontrados para os alcaloides variaram de 6,8 - 18,8 e 20,6 - 57,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para o adsorvente comercial sílica.

Para a avaliação das fases sólidas alternativas biocarvão e SiMen(M)TSC pode-se inferir que ambas apresentaram bons resultados de recuperação, mostrando-se eficiente para o processo de extração em fase sólida para os alcaloides triptamina, *N,N*-dimetilriptamina, harmalol, harmina, harmalina e

tetrahidroharmina; tornando-as assim promissoras para a extração de outras classes químicas de alcaloides em diferentes plantas.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

Os resultados obtidos neste trabalho para a presença dos alcaloides indólicos (triptamina, *N,N*-dimetiltriptamina, harmalol, harmina, harmalina e tetrahidroharmina) na bebida ayahuasca da cidade de Fortaleza/CE irão nortear os próximos trabalhos do Grupo de Análise de Poluentes Orgânicos, do LCP-UFS. Também será possível avaliar a presença de outras classes químicas de alcaloides na bebida ayahuasca, bem como desenvolver e aplicar novas fases sólidas para as técnicas de extração de metabólitos secundários a partir dessas plantas e determinar níveis de concentração significativos para intoxicação em seres vivos de baixa e alta complexidade.

7 REFERÊNCIAS

- [1] Gaujac, A.; Dempster, N.; Navickiene, S.; Brandt, S. D.; de Andrade, J. B. Determination of N,N-dimethyltryptamine in beverages consumed in religious practices by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography ion trap mass spectrometry. *Talanta* **2013**, *106*, 394 - 398.
- [2] Labate, B. C.; Feeney, K. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: implications and challenges. *The International Journal on Drug Policy* **2012**, *23* (2), 154 - 161.
- [3] Gaujac, A.; Navickiene, S.; Collins, M. I.; Brandt, S. D.; de Andrade, J. B., Analytical techniques for the determination of tryptamines and beta-carbolines in plant matrices and in psychoactive beverages consumed during religious ceremonies and neo-shamanic urban practices. *Drug Testing and Analysis* **2012**, *4* (7-8), 636-648.
- [4] Pires, A. P. S.; De Oliveira, C. D. R.; Moura, S.; Dörr, F. A.; Silva, W. A. E.; Yonamine, M. Gas Chromatographic Analysis of Dimethyltryptamine and β -Carboline Alkaloids in Ayahuasca, an Amazonian Psychoactive Plant Beverage. *Phytochemical Analyses* **2009**, *20*, 149-153.
- [5] Gaujac, A.; Martinez, S. T.; Gomes, A. A.; de Andrade, S. J.; Pinto, A. d. C.; David, J. M.; Navickiene, S.; de Andrade, J. B., Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from *Mimosa tenuiflora* inner barks. *Microchemical Journal* **2013**, *109*, 78-83.
- [6] Riga, M. S.; Soria, G.; Tudela, R.; Artigas, F.; Celada, P., The natural hallucinogen 5-MeO-DMT, component of Ayahuasca, disrupts cortical function in rats: reversal by antipsychotic drugs. *The International Journal of Neuropsychopharmacol* **2014**, *17* (8), 1269 -1282.
- [7] Hida, T.; Hasegawa, Y.; Arai, R. Histochemical study of dopamine-degrading monoamine oxidase activity in dopaminergic neurons of rat brain. *Brain Research* **1999**, *842*, 491-495.

- [8] Santillo, M. F.; Liu, Y.; Ferguson, M.; Vohra, S. N.; Wiesenfeld, P. L., Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by beta-carbolines and their interactions in live neuronal (PC12) and liver (HuH-7 and MH1C1) cells. *Toxicology In Vitro* **2014**, 28 (3), 403 - 410.
- [9] Oliveira-Lima, A. J.; Santos, R.; Hollais, A. W.; Gerardi-Junior, C. A.; Baldaia, M. A.; Wuol-Silva, R.; Yokoyama, T. S.; Costa, J. L.; Malpezzi-Marinho, E. L.; Ribeiro-Barbosa, P. C.; Berro, L. F.; Frussa-Filho, R.; Marinho, E. A., Effects of ayahuasca on the development of ethanol-induced behavioral sensitization and on a post-sensitization treatment in mice. *Physiology & Behavior* **2015**, 142, 28-36.
- [10] Lanaro, R.; Calemi, D. B.; Togni, L. R.; Costa, J. L.; Yonamine, M.; Cazenave Sde, O.; Linardi, A., Ritualistic Use of Ayahuasca versus Street Use of Similar Substances Seized by the Police: A Key Factor Involved in the Potential for Intoxications and Overdose? *Journal of Psychoactive Drugs* **2015**, 47 (2), 132-139.
- [11] Winkelman, M., Psychedelics as medicines for substance abuse rehabilitation: evaluating treatments with LSD, Peyote, Ibogaine and Ayahuasca. *Current Drug Abuse Reviews* **2014**, 7 (2), 101 - 116.
- [12] Dewick, P. M.; Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach, 2nd ed., *John Wiley & Sons*: New York.
- [13] Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento. *Editora da UFSC* **1999**.
- [14] Aniszewski, T. Alkaloids – secrets of life. *Elsevier*: Amsterdam, **2007**.
- [15] Patel, K.; Gadewar, M.; Tripathi, R.; Prasad, S. K.; Patel, D. K., A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta-carboline alkaloid "Harmine". *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2012**, 2 (8), 660 - 664.
- [16] Araujo, A. M.; Carvalho, F.; Bastos, M. L.; Guedes de Pinho, P.; Carvalho, M., The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Archives of Toxicology* **2015**.

- [17] Greene, S. L. Novel Psychoactive Substances. *Academic Press*: Boston, **2013**; pp 363-381.
- [18] Disponível em <http://www.chemicalize.org/>, acessado em 23/06/2015.
- [19] CONAD - Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas. Resolução nº1 de 25 de janeiro de 2010. *Diário Oficial da União*. Imprensa Nacional. Ed. 17 de 26/01/2010.
- [20] Santillo, M. F.; Liu, Y.; Ferguson, M.; Vohra, S. N.; Wiesenfeld, P. L., Inhibition of monoamine oxidase (MAO) by β -carbolines and their interactions in live neuronal (PC12) and liver (HuH-7 and MH1C1) cells. *Toxicology in Vitro* **2014**, 28 (3), 403-410.
- [21] Samoylenko, V.; Rahman, M. M.; Tekwani, B. L.; Tripathi, L. M.; Wang, Y.-H.; Khan, S. I.; Khan, I. A.; Miller, L. S.; Joshi, V. C.; Muhammad, I., Banisteriopsis caapi, a unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology* **2010**, 127 (2), 357-367.
- [22] Brierley, D. I.; Davidson, C., Developments in harmine pharmacology — Implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **2012**, 39 (2), 263-272.
- [23] Liu, W.; Cheng, X.; Wang, Y.; Li, S.; Zheng, T.; Gao, Y.; Wang, G.; Qi, S.; Wang, J.; Ni, J.; Wang, Z.; Wang, C., In vivo evaluation of the antitussive, expectorant and bronchodilating effects of extract and fractions from aerial parts of Peganum harmala linn. *Journal of Ethnopharmacology* **2015**, 162 (0), 79-86.
- [24] Herraiz, T.; González, D.; Ancín-Azpilicueta, C.; Arán, V. J.; Guillén, H., β -Carboline alkaloids in Peganum harmala and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology* **2010**, 48 (3), 839-845.
- [25] Pic-Taylor, A.; Motta, L. G. d.; Morais, J. A. d.; Junior, W. M.; Santos, A. d. F. A.; Campos, L. A.; Mortari, M. R.; Zuben, M. V. v.; Caldas, E. D. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (Banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rat. *Behavioural Processes* **2015**.

- [26] Riba, J.; McIlhenny, E. H.; Valle, M.; Bouso, J. C.; Barker, S. A., Metabolism and disposition of *N,N*-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. *Drug Testing and Analysis* **2012**, 4 (7-8), 610-616.
- [27] Stanković, D.; Mehmeti, E.; Svorc, L.; Kalcher, K. New electrochemical method for the determination of β -carboline alkaloids, harmalol and harmine, in human urine samples and in *Banisteriopsis caapi*. *Microchemical Journal* **2015**, 118, 95-100.
- [28] Gaujac, A.; Aquino, A.; Navickiene, S.; de Andrade, J. B., Determination of *N,N*-dimethyltryptamine in *Mimosa tenuiflora* inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC–MS. *Journal of Chromatography B* **2012**, 881–882 (0), 107-110.
- [29] Gaujac, A.; Ford, J. L.; Dempster, N. M.; de Andrade, J. B.; Brandt, S. D., Investigations into the polymorphic properties of *N,N*-dimethyltryptamine by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. *Microchemical Journal* **2013**, 110 (0), 146-157.
- [30] Callaway, J. C., Various alkaloid profiles in decoctions of *Banisteriopsis caapi*. *Journal of Psychoactive Drugs* **2005**, 37 (2), 151-155.
- [31] Huhn, C.; Neususs, C.; Pelzing, M.; Pyell, U.; Mannhardt, J.; Putz, M., Capillary electrophoresis-laser induced fluorescence-electrospray ionization-mass spectrometry: a case study. *Electrophoresis* **2005**, 26 (7-8), 1389-1397.
- [32] Gambelunghe, C.; Aroni, K.; Rossi, R.; Moretti, L.; Bacci, M., Identification of *N,N*-dimethyltryptamine and beta-carbolines in psychotropic ayahuasca beverage. *Biomedical Chromatography: BMC* **2008**, 22 (10), 1056-1059.
- [33] Pires, A. P.; De Oliveira, C. D.; Moura, S.; Dorr, F. A.; Silva, W. A.; Yonamine, M., Gas chromatographic analysis of dimethyltryptamine and beta-carboline alkaloids in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant beverage. *Phytochemical Analysis : PCA* **2009**, 20 (2), 149-153.
- [34] McIlhenny, E. H.; Pipkin, K. E.; Standish, L. J.; Wechkin, H. A.; Strassman, R.; Barker, S. A., Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine ayahuasca by liquid

chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216 (51), 8960-8968.

[35] Moura, S.; Carvalho, F. G.; de Oliveira, C. D. R.; Pinto, E.; Yonamine, M., qNMR: An applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. *Phytochemistry Letters* **2010**, 3 (2), 79-83.

[36] Begum, S. Studies in the harmine series of alkaloids and pharmacologically significant derivatives of yohimbine. Thesis, H. E. J. *Research Institute of Chemistry. University of Karachi*. Pakistan, **1984**.

[37] Bálon, M.; Hidalgo, J. Guardado, P.; Munoz, M. A.; Carmona, C. Acid–base and spectral properties of β -carbolines. Part 1. Tetrahydro- β -carbolines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1993**, 91-97.

[38] Bálon, M.; Hidalgo, J. Guardado, P.; Munoz, M. A.; Carmona, C. Acid–base and spectral properties of β -carbolines. Part 2 Dehydro and Fully Aromatic β -Carbolines. Tetrahydro- β -carbolines. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, **1993**, 99-104.

[39] Smith, T.T., Schaff, M. B., Rupprecht, L. E., Schassburger, R. L., Buffalar, D. M., Murphyc, S. E., Sveda, A. F., Donny, E. C. Effects of MAO inhibition and a combination of minor alkaloids, -carbolines, and acetaldehyde on nicotine self-administration in adult male rats. *Drug and Alcohol Dependence* **2015**, 155, 243–252.

[40] Wu, J., Talwar, D., Johnston, S., Yan, M., Xiao, J. Acceptorless Dehydrogenation of Nitrogen Heterocycles with a Versatile Iridium Catalyst. *Angew. Chem.*, **2013**, 52: 6983–6987.

[41] Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S. Introduction to Spectroscopy, 3rd ed.; *Thomson Learnig*: **2001**.

[42] Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de Cromatografia, *Unicamp*: São Paulo, **2006**.

[43] Atamna, I. Z.; Muschik, G. M.; Issaq, H. J., The Effect of Alkyl Chain Length and Carbon Loading in Silica Based Reversed Phase Columns on the

Separation of Basic Compounds. *Journal of Liquid Chromatography* **1990**, 13 (5), 863-873.

[44] Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. L. Practical HPLC Method Development, 2nd ed.; *John Wiley & Sons*: EUA, 1997.

[45] Gonzalez-Ruiz, V.; Olives, A. I.; Martin, M. A. SPE/RP-HPLC using C1 columns: an environmentally friendly alternative to conventional reverse-phase separations for quantitation of beta-carboline alkaloids in human serum samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, 400 (2), 395-401.

[46] Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L.; Zanella R. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Química Nova* **2011**, 34 (9), 1604-1617.

[47] Jardim, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *Scientia Chromatographica* **2010**, 2(1), 13-25.

[48] Borges, K. B; Figueiredo, E. C.; Queiroz, M. E. C.; Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. *LTC*: Rio de Janeiro, **2015**.

[49] Bliesner, D. M. Validating Chromatographic Methods: A Practical Guide. *Wiley Interscience*, **2006**.

[50] Gosetti, F.; Mazzucco, E.; Zampieri, D.; Gennaro, M. C., Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2010**, 1217 (25), 3929-3937.

[51] Dams, R.; Huestis, M. A.; Lambert, W. E.; Murphy, C. M., Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, 14 (11), 1290-1294.

[52] Prado, A. G. S.; Faria, E. A.; Padilha, P. M., Aplicação e modificação química da sílica gel obtida de areia. *Química Nova* **2005**, 28, 544-547.

- [53] Dias Filho, N. L.; Caetano, L.; Carmo, D. R. d.; Rosa, A. H., Preparation of a silica gel modified with 2-amino-1,3,4-thiadiazole for adsorption of metal ions and electroanalytical application. *J Brazil Chem Soc* **2006**, *17*, 473-481.
- [54] Oliveira, A. B., Beck, J., Daniels, J., Farias, R. L., Netto, A. V. G. Crystal structure of (*E*)-2-[(2*S*,5*R*)-2-isopropyl-5-methyl-cyclo-hexyl-idene]hydrazine-1-carbo-thio-amide. *Acta Crystallographica E* **2014**, E70, o903-o904.
- [55] Jeong, C. Y.; Dodla, S. K.; Wang, J. J., Fundamental and molecular composition characteristics of biochars produced from sugarcane and rice crop residues and by-products. *Chemosphere* **2016**, *142*, 4-13.
- [56] Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 2004, *27* (5), 771-780.
- [57] ANVISA – Agência nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. *Diário Oficial da União*. Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
- [58] Leite, F. Validação em análise química, *Editora Átomo*: Campinas, São Paulo, 5^a ed, 2006.
- [59] Lanças, F. M. Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE, *Átomo*: São Paulo, 2009.

8 APÊNDICES

8.1 Apêndice 1

Tabela S1 Composição da fase móvel utilizando acetonitrila e água na coluna Kinetex com fluxo $0,8 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 45°C e pressão no sistema cromatográfico de 160 Kg cm^{-2} .

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,5	93,5
4	7,0	93,0
6	7,5	92,5
8	8,0	92,0
10	9,0	91,0
12	10,0	90,0
15	12,0	88,0
20	15,0	85,0
25	16,0	84,0
30	17,0	83,0
40	18,0	82,0
50	20,0	80,0
55	25,0	75,0
60	30,0	70,0
65	35,0	65,0
70	45,0	55,0
75	50,0	50,0
80	5,0	95,0
85	5,0	95,0

Tabela S2 Composição da fase móvel utilizando acetonitrila e água na coluna Luna Hilic com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 85 Kgf cm^{-2} .

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0,01	98,0	2,0
2	96,0	4,0
4	94,0	6,0
6	92,0	8,0
8	90,0	10,0
10	88,0	12,0
12	86,0	14,0
14	83,0	17,0
18	81,0	19,0
20	78,0	22,0
25	75,0	25,0
30	73,0	27,0
35	70,0	30,0
40	65,0	35,0
45	60,0	40,0
50	98,0	2,0
55	98,0	2,0

Tabela S3 Composição da fase móvel utilizando acetonitrila e água na coluna Zorbax com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 75 Kg cm^{-2} .

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	8,0	92,0
4	12,0	88,0
8	17,0	83,0
10	20,0	80,0
12	25,0	75,0
15	30,0	70,0
17	40,0	60,0
22	50,0	50,0
25	60,0	40,0
30	5,0	95,0
35	5,0	95,0

8.2 Apêndice 2

Tabela S4 Composição da fase móvel utilizando acetonitrila e água na coluna Zorbax com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 75 Kgf cm^{-2} .

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,2	93,8
4	6,4	93,6
6	6,6	93,4
7	6,8	93,2
8	7,0	93,0
9	8,0	92,0
10	9,0	91,0
15	10,0	90,0
20	11,0	89,0
25	12,0	88,0
30	13,0	87,0
35	14,0	86,0

Tabela S5 Composição da fase móvel utilizando acetonitrila e água na coluna Zorbax com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 75 Kg cm^{-2} .

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,2	93,8
4	6,4	93,6
6	6,6	93,4
7	6,8	93,2
8	7,0	93,0
10	8,0	92,0
11	9,0	91,0
15	10,0	90,0
20	12,0	88,0
22	13,0	87,0
23	15,0	85,0
24	17,0	83,0
25	20,0	80,0
30	40,0	60,0
35	50,0	50,0
40	5,0	95,0
43	5,0	95,0

Tabela S6 Composição da fase móvel utilizando acetonitrila e água na coluna Zorbax com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 75 Kg cm^{-2} .

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,2	93,8
4	6,4	93,6
6	6,6	93,4
7	6,8	93,2
8	7,0	93,0
10	8,0	92,0
11	9,0	91,0
15	10,0	90,0
17	11,0	89,0
18	12,0	88,0
19	13,0	87,0
20	14,0	86,0
21	15,0	85,0
22	17,0	83,0
25	20,0	80,0
30	40,0	60,0
35	50,0	50,0
40	5,0	95,0
43	5,0	95,0

Tabela S7 Composição da fase móvel utilizando metanol e água na coluna Zorbax com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 80 Kg cm^{-2} .

Tempo (min)	Metanol (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,2	93,8
4	6,4	93,6
6	6,6	93,4
7	6,8	93,2
8	7,0	93,0
10	8,0	92,0
15	10,0	90,0
20	14,0	86,0
22	17,0	83,0
25	20,0	80,0
30	40,0	60,0
35	50,0	50,0
40	5,0	95,0
43	5,0	95,0

Tabela S8 Composição da fase móvel utilizando metanol e água na coluna Zorbax com fluxo $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 80 Kg cm^{-2} .

Tempo (min)	Metanol (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,2	93,8
4	6,4	93,6
6	6,6	93,4
7	6,8	93,2
8	7,0	93,0
10	8,0	92,0
11	9,0	91,0
15	10,0	90,0
17	11,0	89,0
18	12,0	88,0
19	13,0	87,0
20	14,0	86,0
21	15,0	85,0
22	17,0	83,0
25	20,0	80,0
30	40,0	60,0
35	50,0	50,0
40	5,0	95,0
43	5,0	95,0

Tabela S9 Composição da fase móvel utilizando metanol e água com adição de solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico na coluna Zorbax com fluxo 1,5 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 80 Kgf cm⁻².

Tempo (min)	Metanol (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,2	93,8
4	6,4	93,6
6	6,6	93,4
7	6,8	93,2
8	7,0	93,0
10	8,0	92,0
11	9,0	91,0
15	10,0	90,0
17	11,0	89,0
18	12,0	88,0
19	13,0	87,0
20	14,0	86,0
21	15,0	85,0
22	17,0	83,0
25	20,0	80,0
30	40,0	60,0
35	50,0	50,0
40	5,0	95,0
43	5,0	95,0

Tabela S10 Composição da fase móvel utilizando metanol e água com adição de solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico na coluna Zorbax com fluxo 1,5 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 80 Kgf cm⁻².

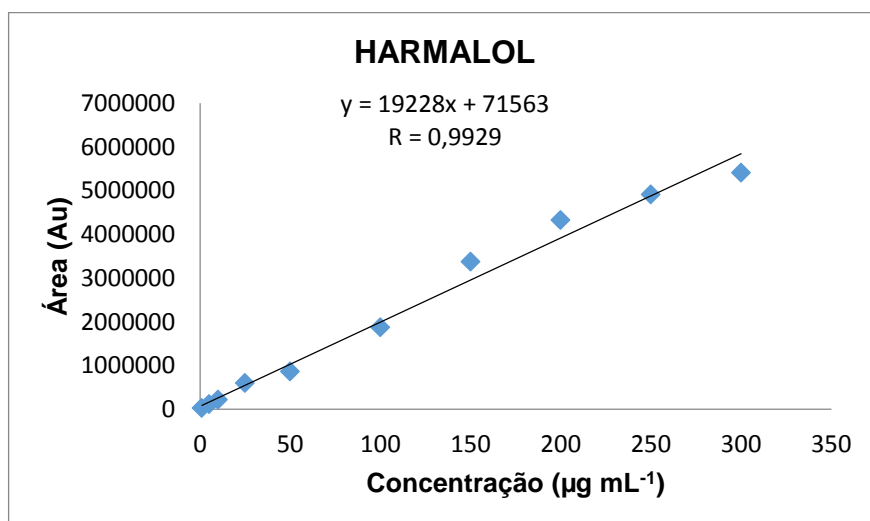
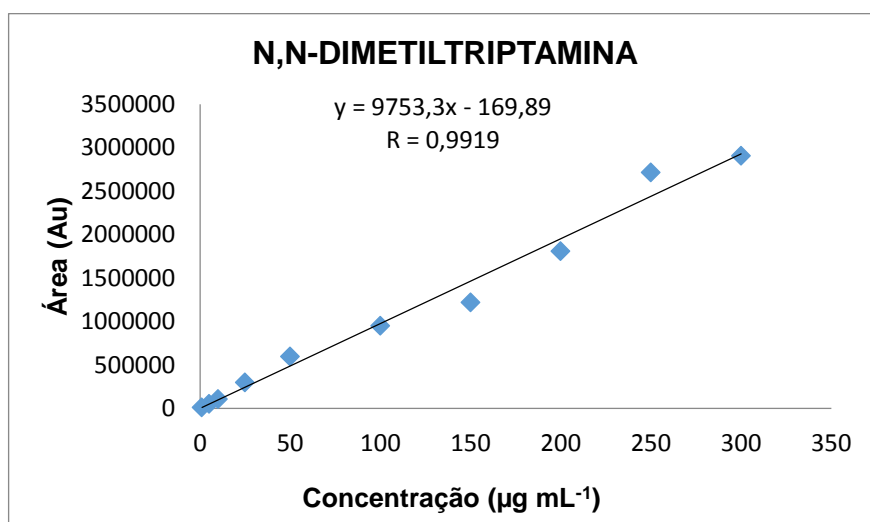
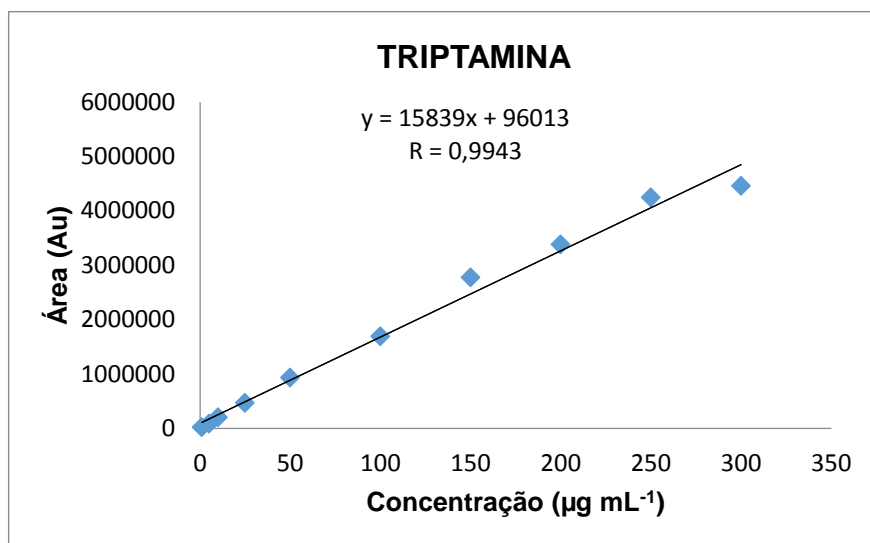
Tempo (min)	Metanol* (%)	Água* (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,5	93,5
4	7,0	93,0
6	7,2	92,8
7	7,4	92,6
8	7,8	92,2
10	8,0	92,0
11	8,5	91,5
15	9,0	91,0
17	10,0	90,0
18	12,0	88,0
19	13,0	87,0
20	14,0	86,0
21	15,0	85,0
22	17,0	83,0
25	20,0	80,0
30	40,0	60,0
35	50,0	50,0
40	5,0	95,0
43	5,0	95,0

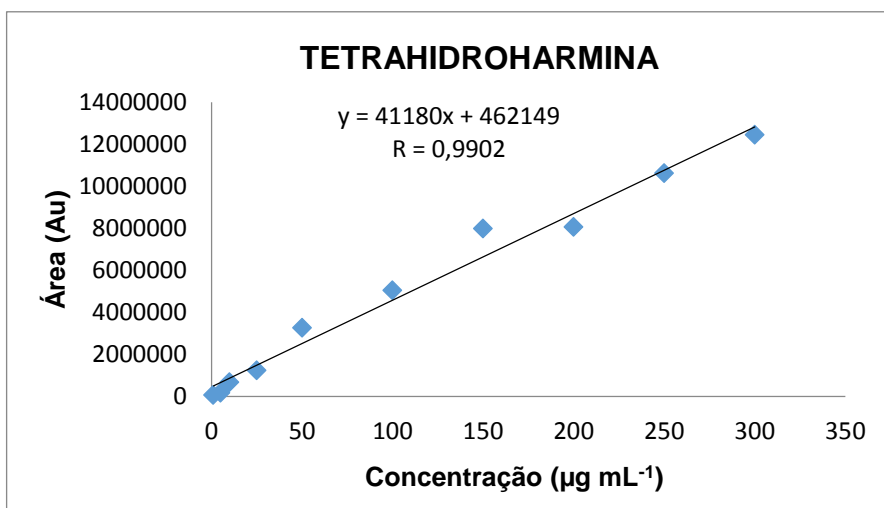
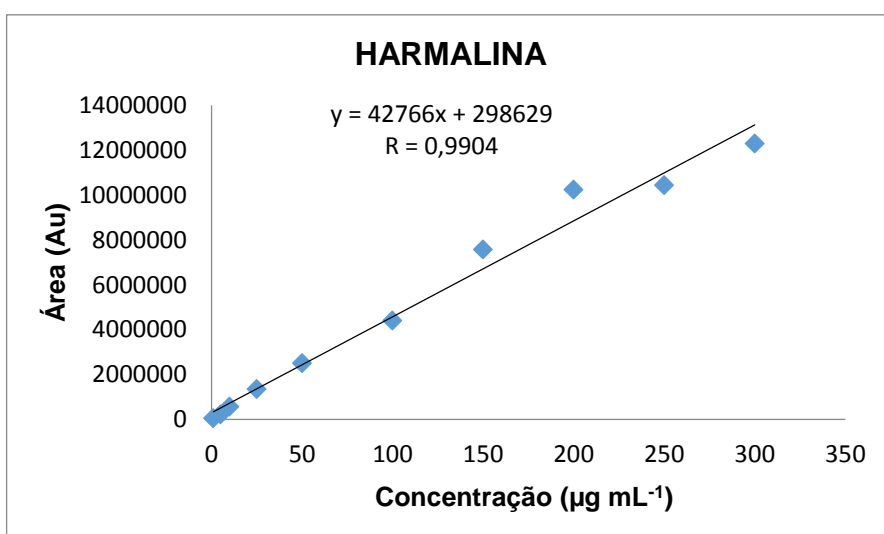
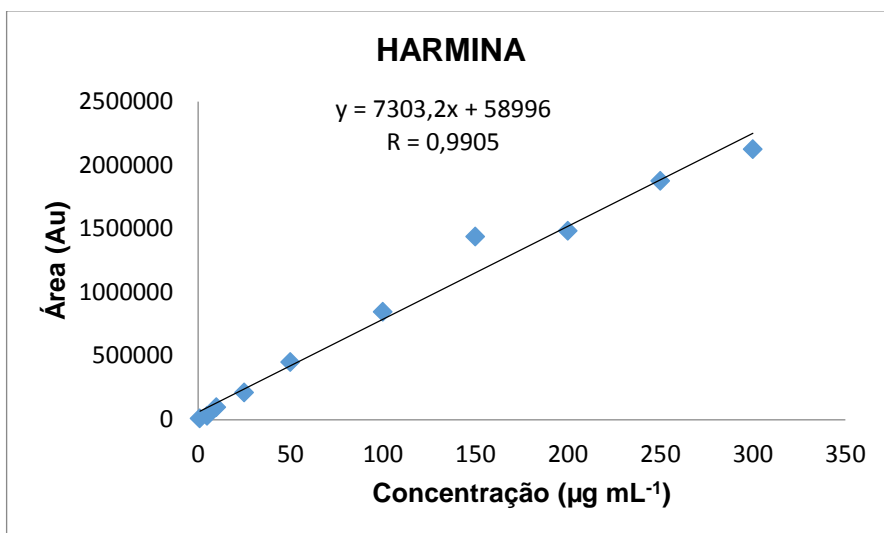
Tabela S11 Composição da fase móvel utilizando metanol e água com adição de solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico na coluna Zorbax com fluxo 1,5 mL min⁻¹, temperatura da coluna de 30°C e pressão no sistema cromatográfico de 80 Kgf cm⁻².

Tempo (min)	Metanol (%)	Água (%)
0,01	5,0	95,0
2	6,0	94,0
3	6,5	93,8
4	6,6	93,6
6	6,7	93,3
7	6,8	93,2
8	6,9	93,1
10	7,0	93,0
11	7,4	92,6
12	7,8	92,2
13	8,0	92,0
14	8,5	91,5
15	9,0	91,0
16	10,0	90,0
18	15,0	85,0
19	17,0	83,0
22	20,0	80,0
27	40,0	60,0
30	50,0	50,0
35	5,0	95,0
40	5,0	95,0

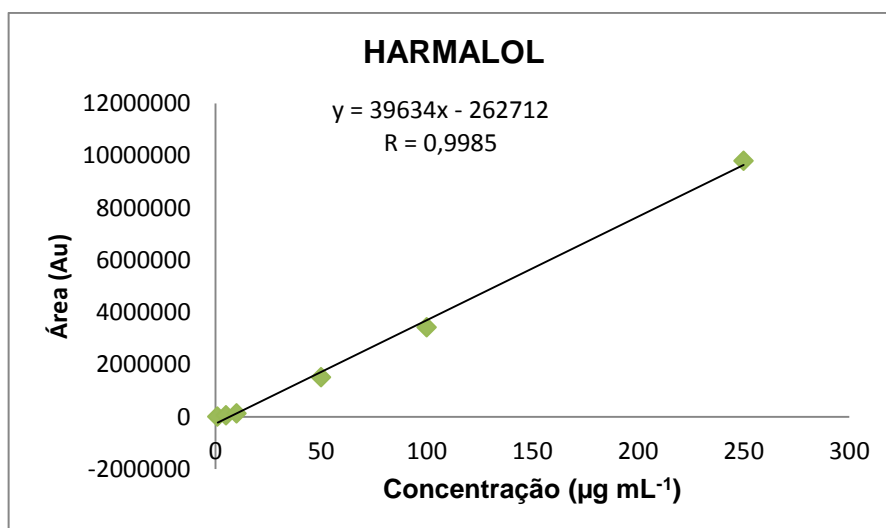
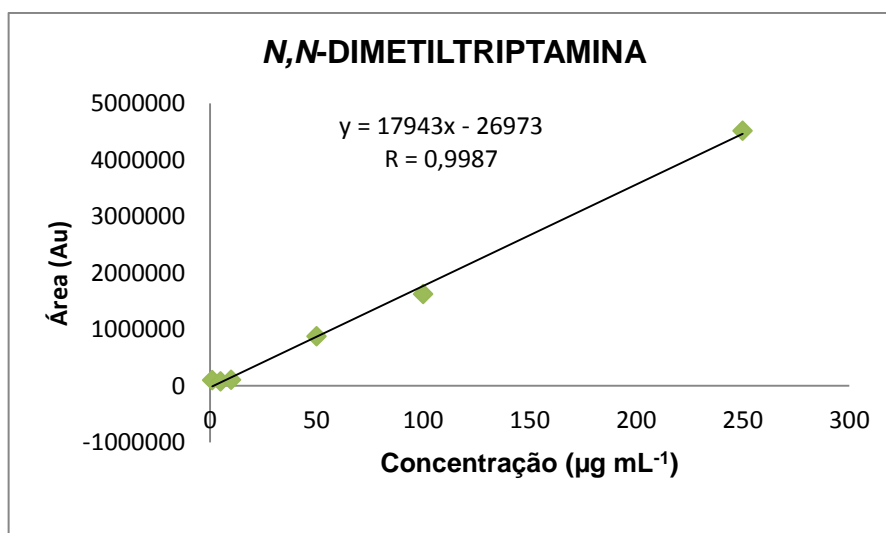
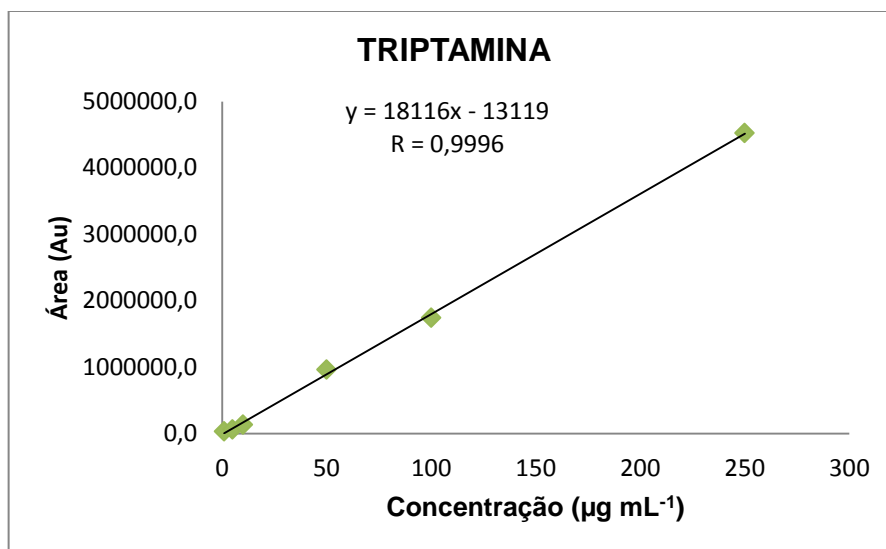
8.3 Apêndice 3

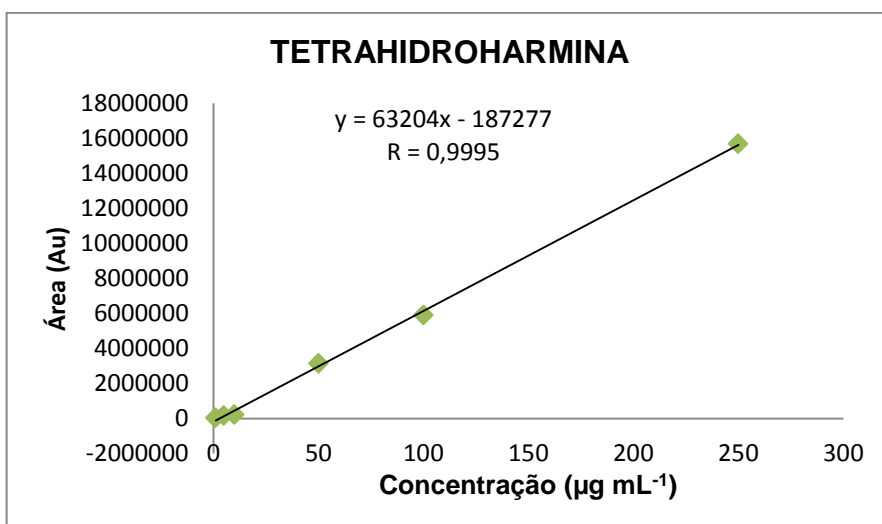
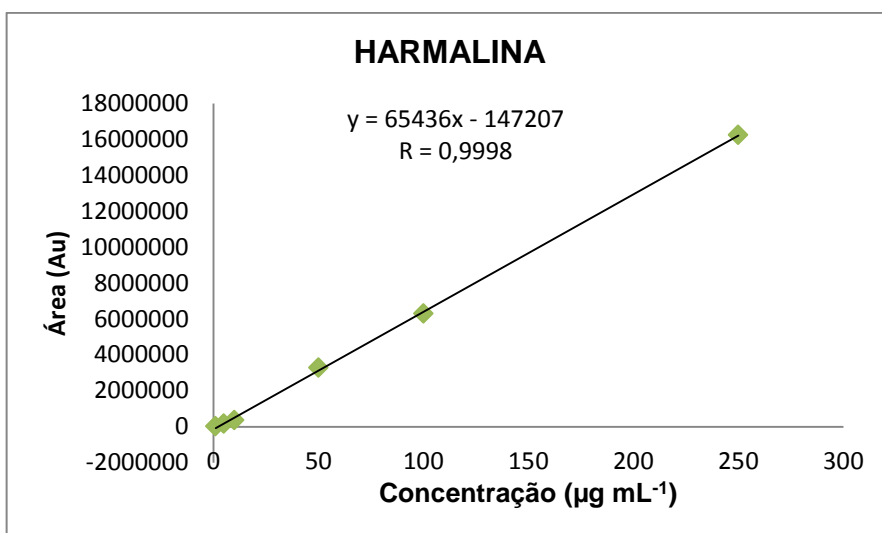
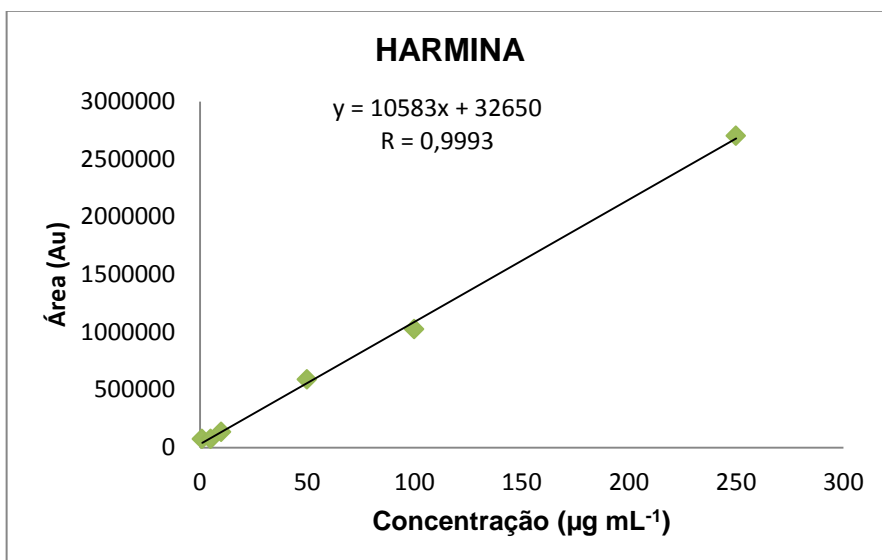
8.3.1 Curva Analítica para o adsorvente Sílica



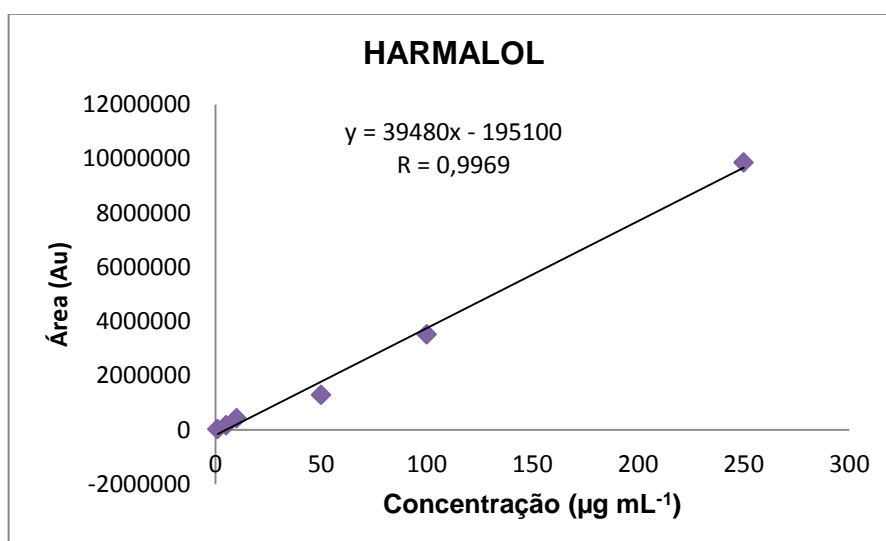
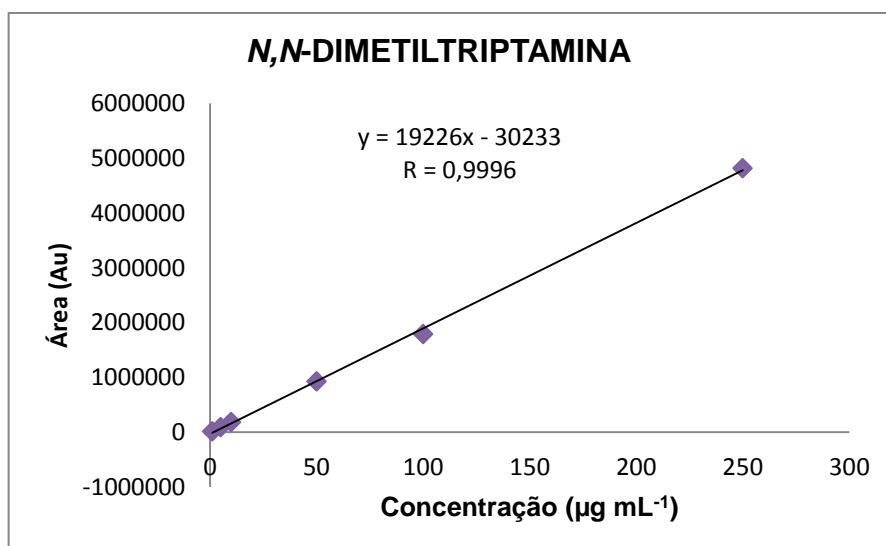
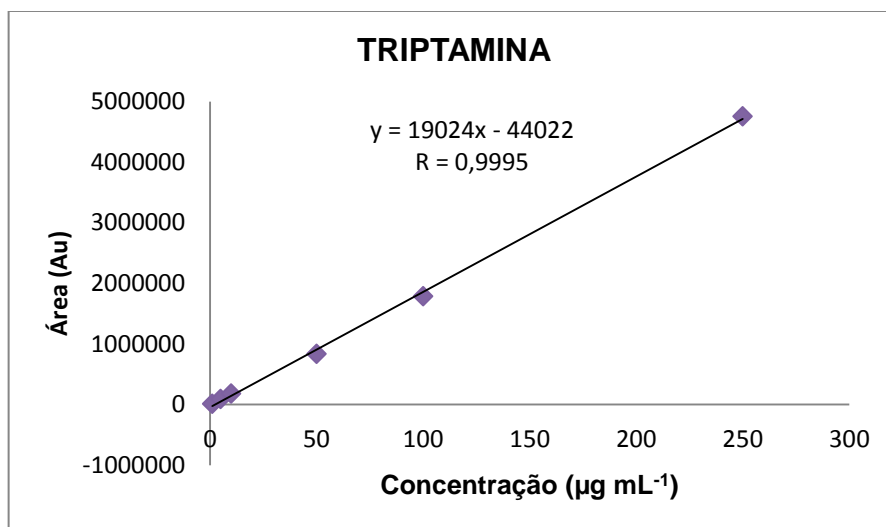


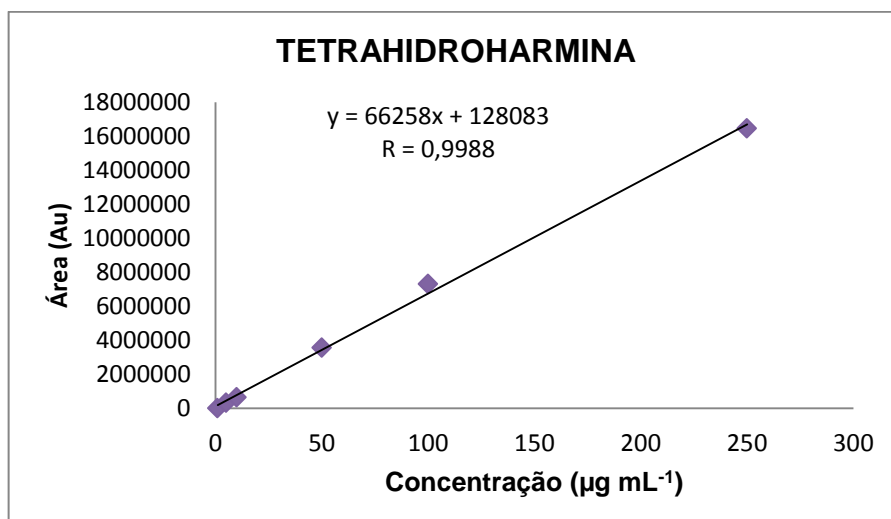
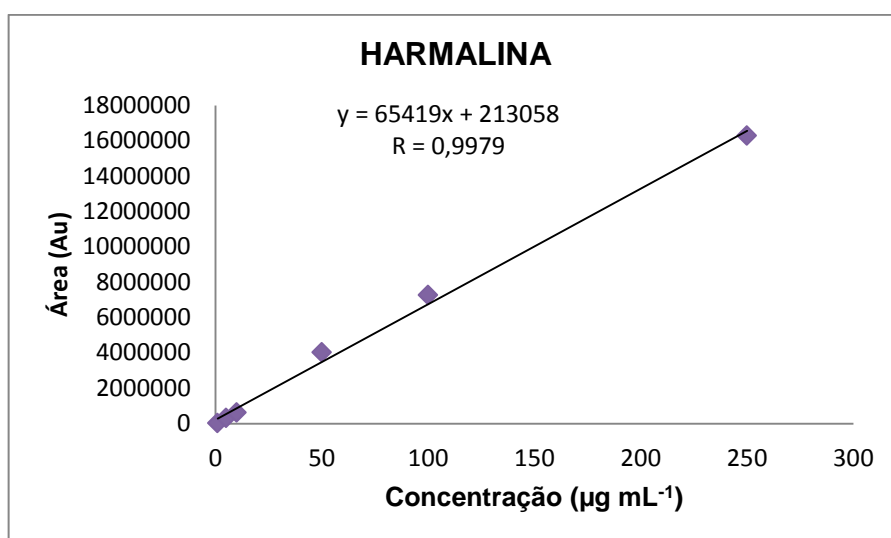
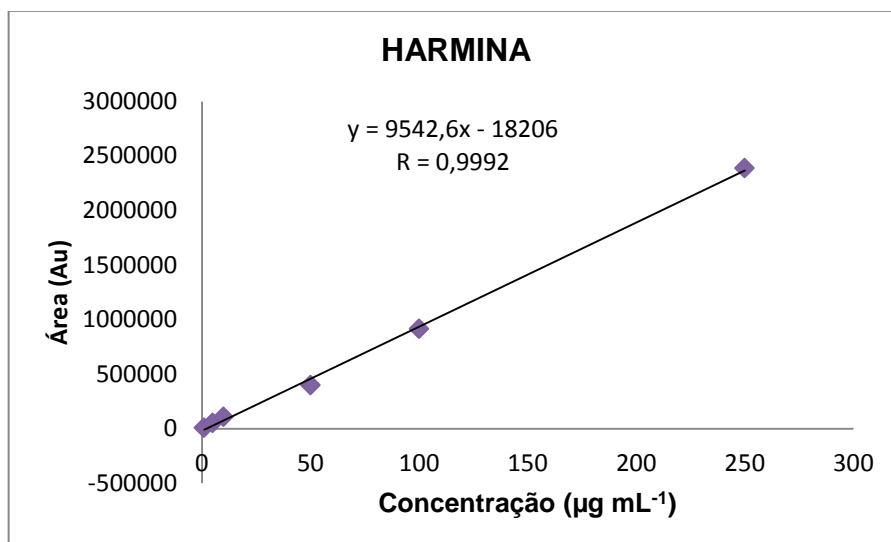
8.3.2 Curva Analítica para o adsorvente Biocarvão





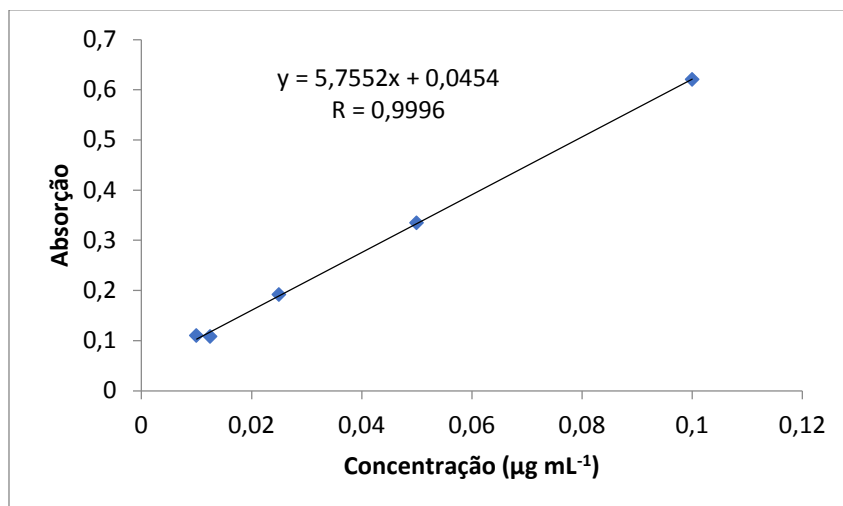
8.3.3 Curva Analítica para o adsorvente SiMen(M)TSC



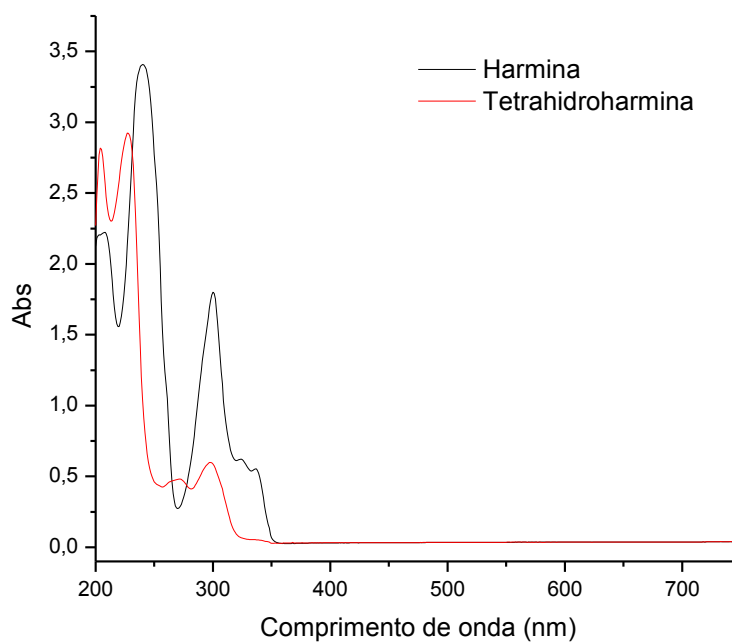


8.4 Apêndice 4

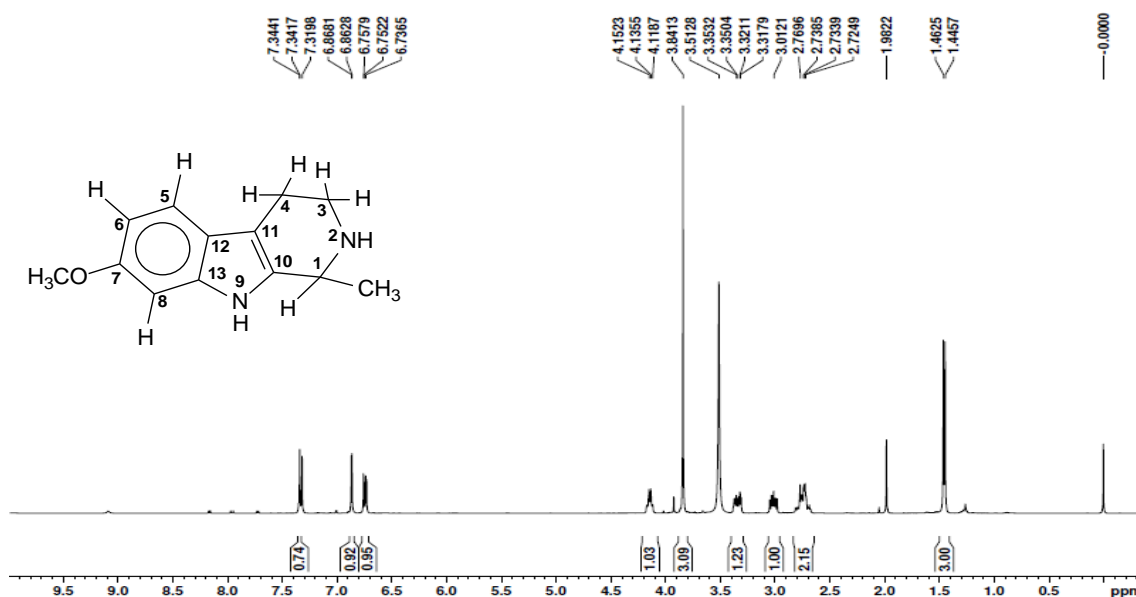
8.4.1 Curva Analítica da Harmina para o grau de pureza espectrofotométrica da Tetrahydroharmina



8.4.2 Varredura na região UV-Vis para o padrão de Harmina com a Tetrahydroharmina sintetizada



8.4.3 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD-d_4) de tetrahidroharmina.



8.4.4 Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 + gotas MeOD-d_4) de tetrahidroharmina.

